



Universidad de Santiago de Compostela  
Facultades de Química y de Medicina y Odontología  
Departamentos de Pediatría y Química Analítica Nutrición  
y Bromatología

**Desarrollo de un método por espectrometría  
de masas en tándem para la determinación  
de acilcarnitinas y la detección neonatal  
de alteraciones del metabolismo  
de ácidos orgánicos y ácidos grasos**

*José Ángel Cocho de Juan*  
2007

Universidad de Santiago de Compostela  
Facultades de Química y de Medicina y Odontología  
Departamentos de Pediatría y Química Analítica Nutrición y Bromatología



**Desarrollo de un método por espectrometría de  
masas en tándem para la de determinación de  
acilcarnitinas y la detección neonatal de alteraciones  
del metabolismo de ácidos orgánicos y ácidos grasos**

Jose Ángel Cocho de Juan  
2007



D. José María Fraga Bermúdez, Catedrático de Pediatría y Dña. M<sup>a</sup> Herminia Bollain Rodríguez, Profesora Titular de Química Analítica de la Universidad de Santiago de Compostela,

Hacen constar que D. José Ángel Cocho de Juan ha realizado, con su dirección, el trabajo titulado “Desarrollo de un método por espectrometría de masas en tándem para la determinación de acilcarnitinas y la detección neonatal de alteraciones del metabolismo de ácidos orgánicos y ácidos grasos”, para optar al grado de Doctor en Química, y autorizan su presentación para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Para que así conste, firmamos la presente certificación en Santiago de Compostela, a 16 de julio de 2007.

## *Agradecimientos*

A todos mis compañeros del Laboratorio de Metabolopatías del Hospital Clínico Universitario de Santiago en general y a Daisy en particular.

De forma muy especial también a Belén que siempre me apoyó y animó a terminarlo.

Quiero expresar un agradecimiento muy especial a mi amigo José María por su constante apoyo.

También agradezco a Minuca su ánimo y paciencia hasta la finalización de este trabajo.

Como no podía ser de otra forma expreso también mi gratitud a Juan, a Ana y a Pila. A todos ellos pido disculpas por el tiempo que les he robado.

## ***Resumen***

El cribado neonatal de alteraciones del metabolismo permite la detección sistemática de este tipo de enfermedades congénitas en edad neonatal. Las técnicas de espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI-MS/MS), desarrolladas en los años 1980, tuvieron gran repercusión en Biomedicina por permitir el análisis directo de moléculas de origen biológico.

En el presente trabajo se describe la puesta a punto, evaluación desde el punto de vista analítico y aplicación a un amplio grupo de población neonatal, de un método de análisis de acilcarnitinas por espectrometría de masas en tándem que es susceptible de ser incorporado a un programa de cribado neonatal para el diagnóstico de alteraciones del metabolismo de los ácidos grasos implicados en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y ácidos orgánicos.

Se trata de la primera iniciativa de este tipo desarrollada en España con base en el análisis de los perfiles de acilcarnitinas generados por ESI-MS/MS en muestras de sangre impregnada sobre papel.

Se presentan los resultados obtenidos con la aplicación de dicho método en un grupo de población neonatal y a partir de los cuales se han podido establecer rangos de referencia, puntos de corte adecuados al diagnóstico de las diferentes patologías diagnosticables con él, y la influencia en estos parámetros de las principales magnitudes vinculadas al estatus del niño en la etapa neonatal: edad, peso, alimentación y edad gestacional.

## ***Abreviaturas***

AA: Aminoácidos

AC: Acilcarnitinas

APPI: Fotoionización a presión atmosférica

APCI: Ionización química a presión atmosférica

CC: Control de calidad

CDC: Center for Disease Control

CPT I: Déficit de la carnitin palmitoil transferasa I

CPT II: Déficit en la carnitin palmitoil transferasa II

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute

CUD: Déficit primario de carnitina o del transportador

CV: Coeficiente de variación

DE: Desviación estándar

DP: Potencial de ruptura (declustering)

DRED: Déficit en la 2,4 dienoil CoA reductasa

ECM: Errores congénitos del metabolismo

EG: Edad gestacional

ERNDIM: European Research Network in Inherited Disorders of Metabolism

ESI: Ionización por electrospray

EWS: Patrones europeos

FAO:  $\beta$ -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos

GA I: Aciduria Glutárica tipo I

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

IS: Patron interno

IVA: Acidemia isovalérica

LB: Límite de blanco

LCHAD:  $\beta$ -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos de cadena larga

LD: Límite de detección

MADD: Déficit múltiple de carboxilasas

MCAD: Déficit en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos de cadena media

MCC: Déficit de la 3 metilcrotonil carboxilasa

MMA: Acidemia metilmalónica

MS/MS: Espectrometría de masas en tándem

MRM: Monitorización de reacción múltiple

OA: Acidurias orgánicas

PA: Acidemia propiónica

PKU: Fenilcetonuria

PM: Peso molecular

PPG: Polipropilenglicol

PT: Aseguramiento de la calidad

SCAD: Déficit en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos de cadena corta

SD: Desviación estándar

VLCAD: Déficit en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos de cadena muy larga

VLCFA: Ácidos grasos de cadena muy larga





## Índice

OBJETIVOS .....	13
INTRODUCCIÓN .....	17
1. CRIBADO METABÓLICO NEONATAL .....	19
1.1. Sucinta historia del Cribado Neonatal.....	19
1.2. Importancia de la espectrometría de masas en tándem en el cribado neonatal.....	21
1.3. Cribado neonatal en España .....	23
1.4. Programa de cribado neonatal en Galicia .....	23
1.5. Toma de muestra.....	24
2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM .....	27
2.1. Principios de la espectrometría de masas.....	27
2.2. Partes básicas de un espectrómetro de masas.....	32
2.3. Tipos de experimentos en MS/MS (modos de adquisición de datos).....	34
2.4. Análisis cuantitativo .....	36
3. APLICACIONES CLÍNICAS DEL ESI-MS.....	37
3.1. Cribado de los errores congénitos del metabolismo.....	37
3.2. Cribado neonatal de trastornos del metabolismo de aminoácidos y ácidos grasos .....	38
3.3. Cribado neonatal de galactosemia .....	39
3.4. Cribado neonatal de enfermedades hepato biliares colestásicas.....	40
3.5. Cribado de enfermedades peroxisomales.....	40
3.6. Cribado de trastornos del metabolismo de purinas y pirimidinas .....	41
3.7. Cribado de la hiperplasia adrenal congénita .....	41
3.8. Identificación y cuantificación de variantes de hemoglobina.....	41
3.9. Monitorización de fármacos.....	44
3.10. Limitaciones de MS/MS.....	44
3.11. Técnicas complementarias a la MS/MS y nuevas aplicaciones en desarrollo.....	45
4. CRIBADO METABÓLICO NEONATAL AMPLIADO USANDO ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM .....	47
4.1. Alteraciones metabólicas estudiadas.....	47
4.2. Análisis de Aminoácidos por MS/MS.....	49
4.3. Análisis de Acilcarnitinas por MS/MS.....	51
4.3.1. Deficiencia de la deshidrogenasa acil-CoA de cadena media.....	53
4.3.2. Deficiencia de la deshidrogenasa acil-CoA de cadena muy larga .....	54
4.3.3. Deficiencia de la deshidrogenasa acil-CoA de cadena corta.....	55
4.3.4. Deficiencia de la deshidrogenasa acil-CoA de cadena larga .....	55
4.3.5. Déficit múltiple acil-CoA deshidrogenasa .....	55
4.3.6. Acidemia metilmalónica .....	55
4.3.7. Acidemia propiónica.....	56
4.3.8. Acidemia glutárica tipo I.....	56
4.3.9. Acidemia isovalérica.....	56
PARTE EXPERIMENTAL .....	57
1. DETERMINACIÓN DE ACILCARNITINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM .....	59
1.1. Instrumentación.....	59

1.2.	<i>Calibrado del Equipo.....</i>	<i>59</i>
1.3.	<i>Estudio y optimización de la Fragmentación.....</i>	<i>61</i>
1.4.	<i>Interferencias.....</i>	<i>65</i>
2.	<b>DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA DETERMINACIÓN DE ACILCARNITINAS EN SANGRE IMPREGNADA EN PAPEL .....</b>	<b>66</b>
2.1.	<i>Reactivos, patrones e instrumentación.....</i>	<i>66</i>
2.2.	<i>Desarrollo del método: etapa preanalítica .....</i>	<i>68</i>
2.3.	<i>Listados de tandas de trabajo en MS/MS.....</i>	<i>71</i>
2.4.	<i>Protocolo de preparación de las placas.....</i>	<i>72</i>
2.5.	<i>Desarrollo del método: Condiciones del experimento MSMS.....</i>	<i>73</i>
2.6.	<i>Desarrollo del método: Cuantificación de las muestras por dilución isotópica .....</i>	<i>74</i>
2.7.	<i>Tratamiento de datos .....</i>	<i>77</i>
2.8.	<i>Validación de tandas de resultados con NeoScreen .....</i>	<i>79</i>
2.9.	<i>Cálculo de rangos de referencia, percentiles y puntos de corte .....</i>	<i>86</i>
2.10.	<i>Control de calidad del método.....</i>	<i>87</i>
3.	<b>ESTUDIO DEL MÉTODO.....</b>	<b>95</b>
3.1.	<i>Estudio de la imprecisión e inexactitud .....</i>	<i>95</i>
3.2.	<i>Linealidad .....</i>	<i>103</i>
3.3.	<i>Límite de detección .....</i>	<i>110</i>
4.	<b>ESTUDIO PARA LA INTRODUCCIÓN DE NUEVOS PATRONES DE ACILCARNITINAS MARCADAS ISOTÓPICAMENTE .....</b>	<b>112</b>
4.1.	<i>Patrones preparados .....</i>	<i>112</i>
4.2.	<i>Estudio para la pureza de los patrones de acilcarnitinas marcadas .....</i>	<i>113</i>
4.3.	<i>Programa de análisis de datos.....</i>	<i>116</i>
4.4.	<i>Estudio con una disolución compuesta complementaria al patrón de acilcarnitinas del CIL.....</i>	<i>117</i>
4.5.	<i>Estudio de las disoluciones de los patrones individuales.....</i>	<i>119</i>
4.6.	<i>Evaluación de las sangres del programa de control de calidad externo del CDC con la disolución objeto de estudio.....</i>	<i>125</i>
4.7.	<i>Resumen del experimento de introducción de IS nuevos, con sangres control .....</i>	<i>128</i>
4.8.	<i>Conclusión de este apartado experimental .....</i>	<i>128</i>
5.	<b>RESULTADOS DEL PROGRAMA DE CRIBADO NEONATAL.....</b>	<b>129</b>
5.1.	<i>Población de estudio .....</i>	<i>129</i>
5.2.	<i>Niveles de AC, marcadores de ECM asociados a OA y FAO, en la población estudiada .....</i>	<i>134</i>
5.3.	<i>Resultados de AC en sangre en la primera semana de vida.....</i>	<i>135</i>
5.4.	<i>Influencia del peso al nacimiento sobre los valores de AC en la primera semana de vida.....</i>	<i>137</i>
5.5.	<i>Influencia de la alimentación en los niveles de AC en la primera semana de vida .....</i>	<i>143</i>
5.6.	<i>Distribución de los niveles de AC en sangre en función de la edad.....</i>	<i>152</i>
5.7.	<i>Influencia de la ingesta de alimentación artificial suplementada con carnitina sobre las AC en sangre .....</i>	<i>163</i>
5.8.	<i>Influencia de la edad gestacional sobre los niveles de AC en sangre, en la primera semana de vida.....</i>	<i>164</i>
5.9.	<i>Gráficos de la evolución de algunos puntos de corte y AC en función de la edad .....</i>	<i>168</i>
5.10.	<i>Incidencia de las enfermedades del metabolismo de los ácidos orgánicos y carnitinas durante el periodo Jul 2000 - Dic 2005 .....</i>	<i>173</i>

5.11.	<i>Estudio de la sensibilidad y especificidad del método de determinación de AC en sangre a partir de los diagnósticos realizados</i>	174
<b>DISCUSIÓN</b>		179
1.	<b>CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO</b>	181
2.	<b>CONTROL DE CALIDAD EN LA DETERMINACIÓN DE AC EN SANGRE</b>	189
2.1.	<i>Programa de Aseguramiento de la Calidad en Cribado Neonatal del CDC (NSQAP)</i>	191
2.1.1.	<i>Programa de CC del CDC</i>	193
2.1.2.	<i>Programa de PT del CDC</i>	195
2.2.	<i>Programa de aseguramiento de la calidad cualitativo para AC en sangre de ERNDIM</i>	197
2.3.	<i>Programa de aseguramiento de la calidad para AC en sangre de Hamburgo</i>	199
3.	<b>PROCESO DE VERIFICACIÓN DEL MÉTODO. CRITERIOS DEL CLSI</b>	201
4.	<b>ESTUDIO PARA LA INTRODUCCIÓN DE NUEVOS IS DE AC</b>	206
5.	<b>ESTUDIO DE LOS RANGOS DE REFERENCIA DE AC EN SANGRE</b>	209
6.	<b>ESTUDIO DE LOS PUNTOS DE CORTE DIAGNÓSTICOS PARA LAS AC EN SANGRE</b>	220
7.	<b>EVALUACIÓN DE RANGOS DE REFERENCIA Y PUNTOS DE CORTE A TRAVÉS DE LA PARTICIPACIÓN EN EL PROYECTO "REGION-4-GENETICS"</b>	226
8.	<b>SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO: VALORES PREDICTIVOS EN BASE A LOS RESULTADOS OBTENIDOS</b>	231
9.	<b>ENFERMEDADES DETECTABLES Y DIAGNÓSTICOS REALIZADOS DURANTE EL PERÍODO DE TRABAJO 2000-2005</b>	234
9.1.	<i>Defectos de la oxidación de los ácidos grasos (FAO)</i>	235
9.2.	<i>Defectos del metabolismo de los ácidos orgánicos (OA)</i>	237
9.3.	<i>Diagnósticos realizados durante el período Julio 2000 a Diciembre de 2005.</i>	239
<b>CONCLUSIONES</b>		249
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		253



## Objetivos



- Desarrollo de un método de análisis de acilcarnitinas por espectrometría de masas en tándem.
- Desarrollo de un protocolo para la determinación de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnada en papel.
- Validación del método de análisis de acilcarnitinas en sangre en papel por espectrometría de masas en tándem.
- Estudio de la posible mejora del método propuesto con la introducción de nuevos patrones deuterados.
- Implantación de un programa interno de control de calidad para acilcarnitinas en sangre.
- Desarrollo de una aplicación informática para la cuantificación de acilcarnitinas en sangre basada en la plataforma Chemoview®
- Aplicación de dicho método a la detección de alteraciones del metabolismo de ácidos orgánicos y ácidos grasos implicados en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial, en sangre impregnada sobre papel recogida en periodo neonatal.
- Medida de acilcarnitinas, con el método propuesto, en un amplio grupo de población con el fin de evaluar como se comportan sus niveles.
- Obtención de rangos de referencia de acilcarnitinas en la población neonatal gallega.
- Obtención de puntos de corte diagnósticos para las diferentes acilcarnitinas analizadas.
- Evaluación de las posibles modificaciones producidas en los puntos de corte en función de la edad, peso, alimentación y edad gestacional.
- Estudiar el impacto de la información obtenida en la disminución del número de falsos positivos que se derivarían de la aplicación del método desarrollado.
- Posibilitar nuevos diagnósticos de estos grupos de enfermedades entre la población neonatal
- Establecer ratios diferenciales en la utilidad de los diferentes parámetros estudiados
- Estudiar la viabilidad de la incorporación de nuevos metabolitos al diagnóstico precoz de nuevos Errores Congénitos del Metabolismo (ECM).





## Introducción



### ***1. Cribado metabólico neonatal***

Se denomina Cribado Metabólico Neonatal al conjunto de actuaciones encaminadas a la detección sistemática de los Errores Congénitos del Metabolismo en edad neonatal. Consiste en la búsqueda de sustancias, elementos y productos metabólicos que, una vez determinados, estudiando a toda la población, identifican a los individuos de alto riesgo, en los cuales habría que completar su estudio a nivel individual mediante pruebas de confirmación del diagnóstico, tanto clínico como bioquímico, para poder instaurar un tratamiento corrector precoz en caso necesario.

Los programas masivos de Detección de Errores Metabólicos Congénitos nacen en muchos países como respuesta a la necesidad de un diagnóstico precoz de determinadas enfermedades asociadas con graves trastornos en la función mental de las personas afectadas.

#### **1.1. Sucinta historia del Cribado Neonatal**

A lo largo del siglo XX, diversos descubrimientos facilitaron un conocimiento más profundo de este tipo de trastornos. Cabe destacar algunos de estos hechos históricos, cuya importancia radica en haber proporcionado el fundamento necesario para el posterior desarrollo de los programas actuales de cribado neonatal.

-1908: Garrod formula el concepto de error congénito del metabolismo

-1934: A. Fölling descubre la fenilcetonuria y posteriormente se relaciona ésta con el retraso mental

-1953: Bickel formula la posibilidad de tratamiento en la fenilcetonuria instaurando una dieta baja en fenilalanina, lo cual motivó la realización de estudios prospectivos en diferentes países.

-1958: En la ciudad de Cardiff se inicia el primer programa de cribado neonatal, analizándose la presencia de ácido fenilpirúvico en la orina a todos los niños a las pocas semanas de vida.

-1963: Guthrie utiliza la muestra de sangre capilar impregnada en papel para la determinación de la concentración plasmática de la fenilalanina por un método de inhibición bacteriana. Así, se asientan las bases metodológicas y conceptuales actualmente vigentes que han facilitado el diagnóstico y tratamiento precoz de múltiples anomalías

## *Introducción*

congénitas o hereditarias que hubieran conducido a daños irreparables sin la existencia de estos programas.

-1970: Con el desarrollo del radioinmunoensayo, se incorpora la detección del Hipotiroidismo Congénito en los programas de Cribado Neonatal.

-1975: El Comité de Cribado Neonatal para Errores del Metabolismo de la Organización Mundial para la Salud, postula los principios que debe cumplir una enfermedad para ser incluida dentro de los programas de Cribado Neonatal, que se basan en las recomendaciones de Wilson y Jugner<sup>1</sup>, y son los siguientes:

- Que la enfermedad curse con daño mental y físico graves o riesgo vital en el periodo neonatal
- Que no exista posibilidad de diagnóstico clínico efectivo en el periodo neonatal
- Que se disponga de un tratamiento efectivo asequible
- Que la instauración del tratamiento de forma precoz mejore el pronóstico clínico
- Que la enfermedad tenga una incidencia relativamente elevada
- Que exista una metodología analítica rápida, fiable y de coste reducido

La detección de los cuatro trastornos más frecuentemente diagnosticados en el periodo neonatal (hipotiroidismo, fenilcetonuria, fibrosis quística e hiperplasia suprarrenal congénita, HSC) implicó tradicionalmente la utilización de una variada tecnología de laboratorio. Para el cribado de hiperfenilalaninemias se desarrollaron técnicas bacteriológicas, de fluorimetría, cromatografía en capa fina y métodos enzimáticos. La detección del hipotiroidismo se puso en marcha mediante el estudio de la tirotropina con técnicas de radioinmunoanálisis, inmunofluorescencia a tiempo retardado (DELFIA®) y enzimoimmunoanálisis (ELISA). El cribado neonatal de HSC por déficit de 21-  $\alpha$  -hidroxilasa se basó en la medida de la 17-  $\alpha$ -hidroxiprogesterona en sangre seca recogida sobre papel, utilizando técnicas de DELFIA®. La determinación de aminoacidopatías en sangre se desarrolló mediante cromatografía en capa fina, pero recurriendo en ocasiones a una muestra de orina adicional para confirmar los resultados. Finalmente, el cribado de la fibrosis quística se lleva a cabo midiendo la tripsina inmunorreactiva (TIR) en el espécimen de sangre seca mediante DELFIA® o ELISA y posterior estudio de ADN.

## ***Introducción***

La idea original de Guthrie,<sup>2</sup> además de incorporar la recogida de sangre impregnada en papel para el cribado masivo de la población, evidenció que la eficacia y universalidad del cribado neonatal podían ser aún mayores si se utilizase un método único para la detección de distintos trastornos, en vez del sistema utilizado hasta entonces que consistía en un ensayo bacteriológico específico para el diagnóstico de cada trastorno individual. Sin embargo, la cromatografía en papel usada inicialmente no fue lo suficientemente sensible para el cribado neonatal en los primeros días de vida.<sup>3,4</sup> Para superar estos inconvenientes se utilizó la cromatografía en capa fina para el cribado en orina neonatal, con importantes inconvenientes derivados fundamentalmente de la gran variabilidad de la concentración de la orina, produciendo multitud de falsos positivos en las orinas más concentradas y falsos negativos en orinas más diluidas.<sup>5</sup>

### **1.2. Importancia de la espectrometría de masas en tándem en el cribado neonatal**

La espectrometría de masas en tándem (en sus siglas inglesas MS/MS), es la herramienta más poderosa y versátil que ha aparecido en los últimos 30 años en el campo del diagnóstico neonatal de los ECM. Aunque presenta como principales inconvenientes cierta complejidad de manejo e interpretación, la introducción de una etapa de ionización mediante electronebulización como método de enlace entre la cromatografía líquida y la espectrometría de masas, ha facilitado enormemente la incorporación de esta tecnología al laboratorio clínico<sup>6</sup>.

La espectrometría MS/MS permite expandir el campo del cribado neonatal de una forma extraordinariamente amplia, incluyendo, como se describirá más adelante, además de las hiperfenilalaninemias, la detección de al menos otras 10 aminoacidopatías (dos de las cuales, la enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce y la homocistinuria, no suelen incorporarse de otro modo al cribado habitual, ya que requieren técnicas propias) y la detección de trastornos de la degradación de ácidos orgánicos y de la oxidación de ácidos grasos.<sup>7</sup> En un único espécimen de sangre se pueden detectar hasta 40 trastornos, lo que significa un cambio fundamental en el manejo del diagnóstico neonatal tal y como se realizaba hasta la introducción de estas técnicas.

## ***Introducción***

En segundo lugar, disminuye considerablemente el número de falsos positivos a pesar del incremento en el número de trastornos diagnosticados.<sup>8</sup> Esto ocurre incluso realizando la toma de muestra en las primeras 24 h de vida. El grupo con mayor experiencia en la actualidad, Neo Gen Screening Program en Pittsburgh, describió en 1998 un 0,26 % de falsos positivos, si bien otros estudios han aportado diferentes datos en países donde se lleva a cabo este tipo de cribado desde hace años. Tal es el caso de Australia, donde entre 1998 y 2002 se describió una tasa de detección doble de la obtenida en años anteriores, con un 0.15% de falsos positivos,<sup>9</sup> o de Alemania,<sup>10</sup> con doble detección que con los métodos convencionales, 0.33% de falsos positivos y un valor predictivo positivo de 11.3% entre 1998 y 2001.

El hecho de reducir la tasa de resultados falsos positivos disminuye notablemente el gasto del cribado neonatal, ya que no se requiere procesar de nuevo un número elevado de resultados dudosos y, lo que es aún más importante, evita la solicitud innecesaria de una nueva muestra para repetir las pruebas analíticas. Este aspecto no es desdeñable desde el punto de vista de la ansiedad generada en las familias ante una sospecha diagnóstica hasta que reciben un resultado definitivo. Sobre todo teniendo en cuenta que en los resultados falsos positivos en que no se confirma la enfermedad, es frecuente que la sensación de inseguridad de las familias se prolongue en el tiempo incluso después de obtener un diagnóstico final. En este sentido, Waisbren et al.<sup>11</sup> observaron el efecto del cribado expandido en el desarrollo de los niños diagnosticados y en el estrés paterno, encuestando a un total de 258 padres de niños con ECM detectadas por programas de cribado, casos detectados clínicamente, falsos positivos y neonatos con resultados normales. Se encontró una reducción significativa en la morbilidad, hospitalización y demanda global de asistencia médica para los verdaderos positivos. Pero, por otra parte, se constató por primera vez de forma objetiva y cuantitativa el efecto que causan los falsos positivos de MS/MS en cuanto a trastorno de la vida familiar, hospitalizaciones innecesarias y elevadas puntuaciones en la escala establecida en el Parental Stress Index and Parent-Child Dysfunction.

A nivel asistencial, la logística basada en cálculos de coste/beneficio considera la disponibilidad de un centro de MS/MS por cada 100.000 nacidos.<sup>12</sup> Este centro se dedicaría exclusivamente a la parte analítica del proceso. En combinación con este centro

## ***Introducción***

de análisis bioquímico han de estar las Unidades Clínicas de Errores Innatos del Metabolismo de los distintos hospitales terciarios, que se encargarían del diagnóstico, control y seguimiento clínico de los pacientes.

### **1.3. Cribado neonatal en España**

En España el primer programa de cribado neonatal nació en la ciudad de Granada, en 1968. El laboratorio fue creado por la Dirección General de Sanidad, por iniciativa del Profesor F. Mayor-Zaragoza. En 1978, nace el Plan Nacional de Subnormalidad, integrado dentro del Real Patronato de Educación y Atención a Deficientes, al amparo del cual se crean varios laboratorios vinculados en su mayoría a universidades. En 1982, los Programas de Detección Precoz de Alteraciones Metabólicas-Congénitas pasan a depender de las distintas Comunidades Autónomas.

En la actualidad, existen 22 Centros de Cribado Neonatal en España, que ofrecen, como mínimo, las pruebas de detección del hipotiroidismo congénito y fenilcetonuria, a la totalidad de los recién nacidos. El cribado de hiperplasia adrenal congénita, fibrosis quística, galactosemia, hemoglobinopatías, etc. se realiza sólo en algunos centros y, desde el año 2000, el laboratorio de Metabolopatías del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago es el único en España que realiza el cribado neonatal ampliado en el que se incluye el empleo de la MS/MS. Los diferentes laboratorios realizan una memoria anual de sus actividades que está disponible en la página web de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC)<sup>13</sup> y que es publicado periódicamente por parte del Real Patronato sobre Discapacidad.<sup>14</sup> Asimismo, algunas Comunidades Autónomas publican periódicamente evaluaciones de los resultados obtenidos.<sup>15</sup>

Son ya más de 9 millones los niños que han sido sometidos al cribado neonatal en España y, a lo largo de todo este período, las estrategias de cribado han ido cambiando tanto en lo que se refiere a la cobertura de los programas como a su organización interna y a su integración con las unidades de seguimiento.

### **1.4. Programa de cribado neonatal en Galicia**

El programa de cribado neonatal comienza en Galicia en 1978 presentando desde su inicio la novedad de que incorpora el análisis de muestras de sangre y orina. Actualmente, con



## ***Introducción***

una cobertura prácticamente del 100% de la población neonatal, son más de 650.000 los recién nacidos analizados hasta enero de 2007.

En Febrero de 2000, con la incorporación de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS), comienza una nueva era con la evaluación, implantación aplicación sistemática en un grupo de población neonatal del método que hace uso de la MS/MS, y que es objeto del presente trabajo de tesis doctoral. En noviembre de 2000, se amplía el perfil de acilcarnitinas y es en enero de 2001 cuando se incorporan experimentos de monitorización de reacción múltiple (MRM) para aminoácidos básicos. En enero de 2002 se añade el estudio de la galactosemia y en enero de 2004 se aplica la metodología a las muestras de orina impregnadas en papel.

### **1.5. Toma de muestra**

Las muestras de sangre impregnada sobre papel tienen unas características físicas diferentes de las de las muestras líquidas y que afectan a la precisión y exactitud de los ensayos realizados.<sup>16</sup> Las imprecisiones están habitualmente por encima del 6%, alcanzando incluso el 10% debido a problemas de homogeneidad en la distribución de la sangre y en función de la composición del papel elegido.

La estandarización se ve afectada por el tipo de papel, el volumen de sangre impregnado, el hematocrito y la parte de la mancha de sangre de donde es tomado un disco para realizar las pruebas. En contrapartida, se trata de muestras que, una vez secas, se mantienen estables durante largos períodos de tiempo, debido a que los procesos de degradación biológica tienen lugar habitualmente por vía húmeda.

Las muestras de sangre seca para el cribado neonatal son obtenidas en la mayoría de las ocasiones por el personal de los centros sanitarios durante los primeros días de vida. Sin embargo se trata de un procedimiento fácilmente realizable también por personal no sanitario, si se siguen unas sencillas normas.<sup>17,18</sup>

Las muestras de sangre seca recogida sobre papel para detectar Errores Congénitos del Metabolismo tienen en la actualidad un amplio uso fuera también de este renovado campo. Con ligeras modificaciones en las condiciones de conservación o en el tipo de papel, se emplean también para la detección de anemias, de enfermedades infecciosas, estudios de ADN, etc.

## ***Introducción***

La sangre debe ser obtenida de la porción media o lateral de la superficie plantar del talón<sup>19</sup> cuando se trata de recién nacidos, aunque también es válida la punción en el dedo si se trata de niños mayores. Debe evitarse siempre el área central del talón. La muestra puede también obtenerse por punción venosa e incluso para algunas determinaciones puede utilizarse la sangre del cordón umbilical.



**Figura 1. Toma de muestra de sangre sobre papel directamente del talón de un recién nacido**

La punción debe realizarse sobre el pie convenientemente masajeadado para aumentar el flujo sanguíneo y en una zona previamente desinfectada con alcohol al 70%. Con una lanceta estéril, se debe realizar una incisión de aproximadamente 2 mm. de profundidad para que el flujo sanguíneo sea suficiente. Desechada la primera gota de sangre, por contener restos celulares, se dejan fluir las gotas para que caigan sobre el papel, presionando suavemente el pie.

La sangre debe impregnar bien el papel para permitir una adecuada estandarización de las técnicas. Se debe dejar secar a temperatura ambiente y fuera de la luz solar directa y asegurar su almacenamiento en condiciones adecuadas si no va a ser procesada en las 24-48 horas siguientes.

El papel empleado para la recogida, responde a unas características muy especiales de absorción y su uso controlado permite el intercambio de muestras entre laboratorios. Se considera óptimo que las manchas de sangre contengan al menos 75  $\mu\text{L}$  (13 mm. de diámetro aproximadamente). Habitualmente es suministrado a los centros sanitarios y a las

## ***Introducción***

familias por los diferentes centros de cribado neonatal junto con el resto del material necesario para la toma de muestra y la ficha de registro.

Hay diferentes situaciones que pueden aconsejar la repetición de la toma de muestra o la modificación de la fecha recomendada con carácter general. Por ejemplo, en los recién nacidos de bajo peso, menor de 2000 g, es aconsejable repetir la toma de muestra dos semanas después. Asimismo, también se realizará una segunda toma de muestra en caso de nutrición parenteral o en presencia de cualquier patología que cuestione la validez del resultado. En caso de transfusión sanguínea previa, se recomienda la repetición a la semana y al mes post-transfusión.

En España, los diferentes programas de cribado neonatal existentes no contemplan las mismas condiciones para la recogida de la muestra (doble muestreo, muestra única, edad recomendada para la toma de muestra, recogida de muestra de orina al mismo tiempo que la sangre, etc.). En la actualidad, el 65% de los centros realiza una extracción única de sangre a partir del tercer día de vida y el 35% restante realiza una doble extracción. Tres laboratorios recogen muestras de sangre y orina.

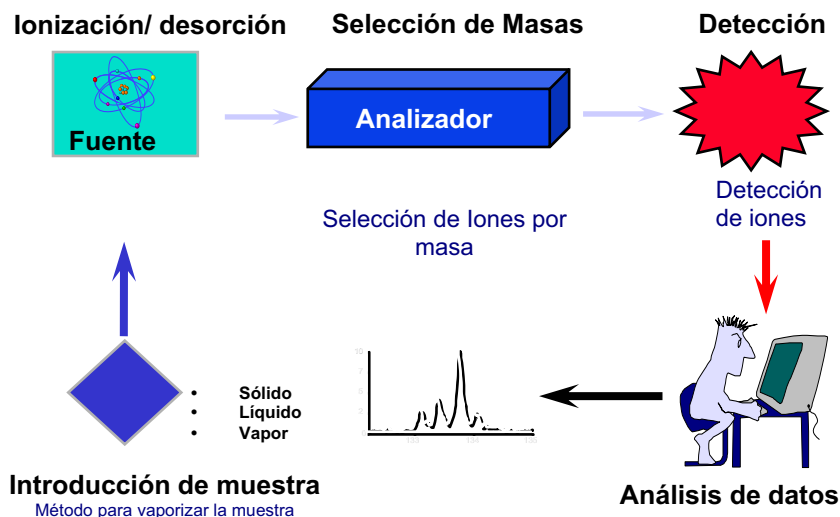
## **2. Espectrometría de masas en tándem**

### **2.1. Principios de la espectrometría de masas**

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica que proporciona información tanto cualitativa (estructura) como cuantitativa (masa molecular o concentración) de las moléculas analizadas previamente convertidas en iones. Las moléculas de interés, forman parte generalmente de una mezcla heterogénea que no requiere necesariamente una separación previa, y se someten en primer lugar a una fuente de ionización donde se ionizan adquiriendo carga negativa o positiva. Los iones atraviesan el analizador de masas hasta que alcanzan diferentes partes del detector de acuerdo con su relación masa/carga ( $m/z$ ). Una vez en contacto con el detector, se generan señales que son registradas en el sistema informático y representadas en un espectro de masas que muestra la abundancia relativa de las señales en función de su relación  $m/z$ .

Así pues, para el análisis de las muestras por MS se producen 3 procesos básicamente (Figura 2):

- Ionización de la muestra
- Análisis de la muestra ionizada
- Detección de los compuestos formados



**Figura 2. Esquema del proceso de análisis por espectrometría de masas**

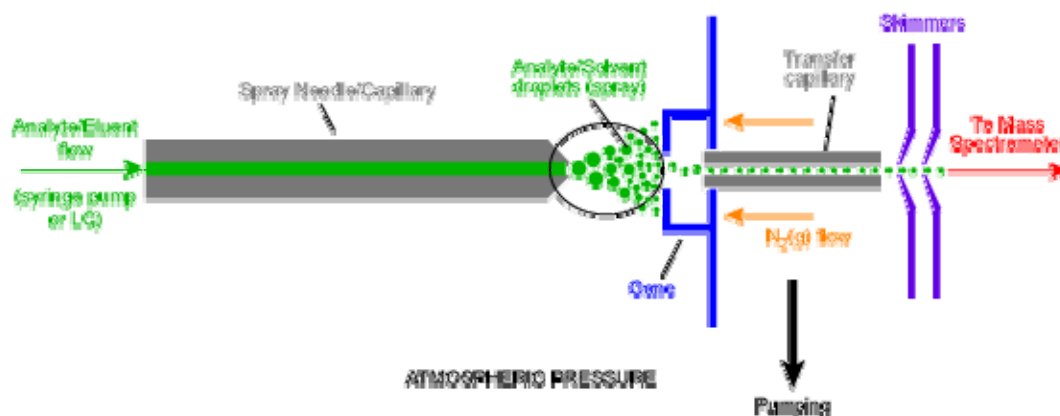
## ***Introducción***

La ionización de la muestra es clave y puede llevarse a cabo de diferentes formas, según la naturaleza de la propia muestra y lo que se pretenda detectar en el análisis. Puede efectuarse en condiciones de alto vacío, por impacto electrónico (EI), o a presión atmosférica (API). En este último caso, si se trata de un análisis en fase líquida, se realizará una ionización por electrospray (ESI), mientras que si es en fase gaseosa, se efectuará una ionización química (APCI) o bien una fotoionización (APPI). Las técnicas de ionización más empleadas en el laboratorio clínico son la ESI y la ACPI.

### **a. Ionización por electrospray (ESI)**

El fenómeno de electrospray se conoce desde hace cientos de años, pero hasta comienzos del siglo XX no se comprendió verdaderamente lo que podía significar su aplicación a la ciencia.<sup>20</sup> A finales de los años 1960, los experimentos pioneros de Dole et al<sup>21</sup> desarrollaron la aplicación del electrospray a la ionización de especies químicas intactas (ESI). Pasaron otros 20 años hasta que el trabajo realizado en el laboratorio de John Fenn demostrara por primera vez la utilidad de la ESI para ionizar compuestos de importancia biológica y alta masa molecular, lo que abrió la puerta a su consiguiente análisis por espectrometría de masas.<sup>22</sup> Este trabajo le proporcionó a John Fenn el premio Nóbel de Química en 2002, como uno de los pioneros de la espectrometría de masas.<sup>23</sup> En las publicaciones originales de finales de los años 1980, Fenn y sus colaboradores demostraron los principios básicos experimentales de la técnica ESI y describieron las primeras aplicaciones: la ionización suave de compuestos no volátiles y térmicamente lábiles, de proteínas con cargas múltiples y de complejos intactos. Actualmente, la ESI-MS es una herramienta básica de amplia aplicación en Biología.

La fuente ESI ha experimentado un desarrollo continuo desde sus inicios, pero el esquema básico continúa siendo el mismo.



**Figura 3. Esquema de una fuente de ionización por electrospray**

El analito es introducido en la fuente en disolución bien mediante una bomba inyectora o bien procedente del eluido de un sistema de cromatografía líquida. Las velocidades del flujo suelen ser del orden de  $1\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ . El analito pasa a través de un tubo capilar de acero inoxidable o de cuarzo sílice, al cual se le aplica una elevada diferencia de potencial (con respecto al electrodo contador) habitualmente en el rango de 2.5 a 6 kV. Esto fuerza la nebulización de las gotas cargadas en el capilar, con una carga superficial de la misma polaridad que el propio capilar. Las gotas son repelidas del capilar hacia el cono de la fuente de muestreo del electrodo contador (en azul en la Figura 3). Con la ayuda de una elevada temperatura en la fuente ESI y/o de gas nitrógeno, a medida que las gotas atraviesan el espacio entre el capilar y el cono, van reduciendo continuamente su tamaño, por evaporación del solvente, lo que supone un incremento de la densidad de carga superficial conforme disminuye el radio de las gotas.

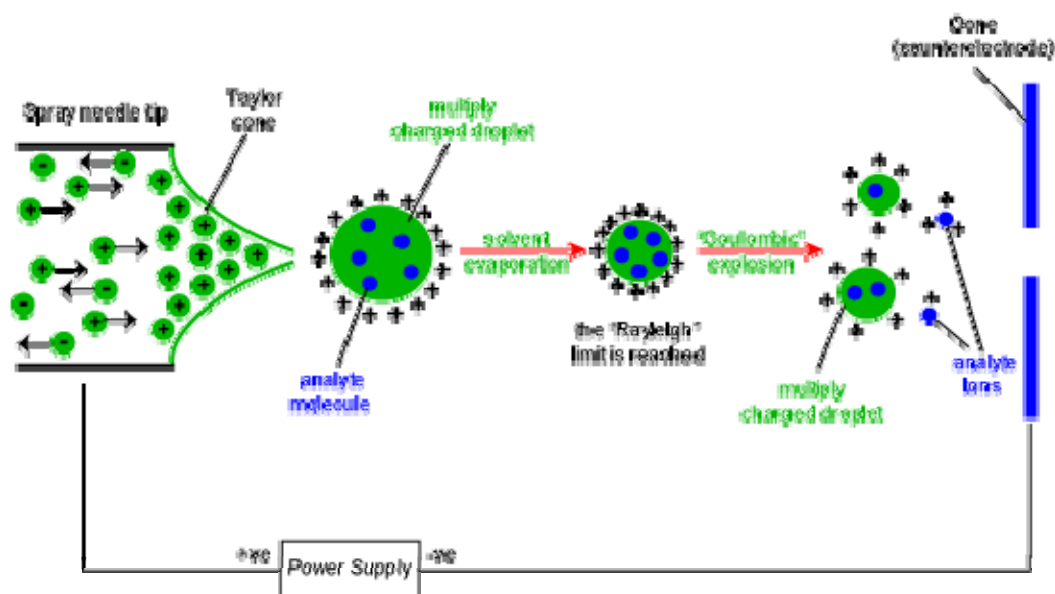


Figura 4. Esquema del proceso de ionización por electrospray

Finalmente, la fuerza del campo eléctrico en las gotas cargadas alcanza un punto crítico en el cual es cinética y energéticamente posible el paso a fase gaseosa para los iones de la superficie. En ese momento, la tensión superficial no es capaz de mantener la carga (límite de Rayleigh), por lo que se produce una “explosión Coulombica” y la gota se rompe en gotas más pequeñas. El proceso puede repetirse hasta que sólo existan moléculas de analito cargadas “desnudas”, que no son estrictamente iones, y pueden tener una o varias cargas. Así pues, la transferencia de las especies iónicas desde una solución a la fase gaseosa por medio de ESI implica tres etapas (Figura 4):

- Dispersión de un spray fino de gotas cargadas, seguido de
- evaporación del solvente, y
- liberación de los iones de las gotas altamente cargadas

Este es un método de ionización verdaderamente suave dado que el analito retiene muy poca energía residual. De ahí la enorme importancia de la técnica ESI-MS en estudios biológicos donde a menudo se requiere la conservación de las interacciones no covalentes entre las moléculas, incluso en fase gas. La principal desventaja de la técnica es que se produce muy poca o ninguna fragmentación. Para estudios de elucidación estructural, esto supone la necesidad de la espectrometría de masas en tándem para conseguir la fragmentación.

## Introducción

En resumen, las características que definen la ionización por Electrospray con respecto a otras técnicas de ionización son tres:

- Capacidad de producir iones con cargas múltiples, permitiendo que compuestos de peso molecular muy alto queden registrados con cargas múltiples en un rango  $m/z$  mucho menor.
- Las muestras analizadas deben ser introducidas en solución, posibilitando así una compatibilidad natural entre ESI con muchos tipos de técnicas de separación (HPLC, Electroforesis capilar...).
- Se trata de una técnica especialmente “blanda” lo que posibilita, por ejemplo, la preservación en la fase gas de interacciones no covalentes entre moléculas existentes en solución, así como el estudio de conformaciones moleculares en tres dimensiones.

### b. Ionización química (APCI)

APCI: Utiliza una descarga de corriente y es un proceso en tres pasos, como se aprecia en la Figura 5:

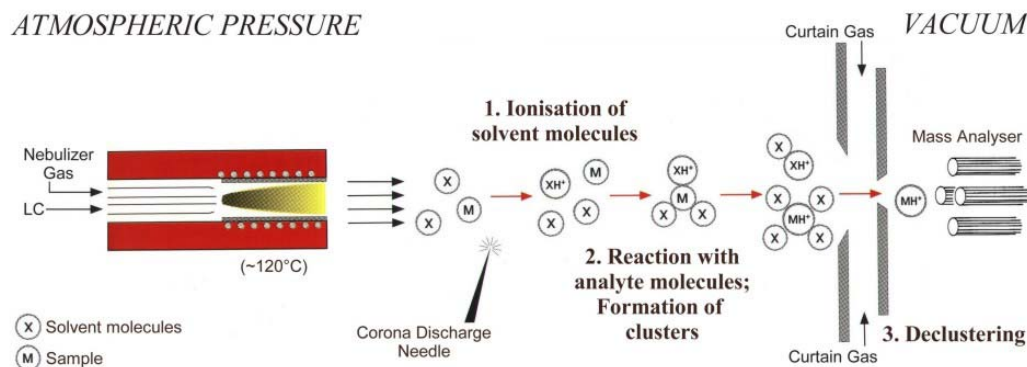


Figura 5. Esquema del proceso de ionización química a presión atmosférica

- 1) Mediante un alto voltaje, se ioniza el gas nebulizante (aire o nitrógeno) formando los primeros iones.
- 2) Estos primeros iones reaccionan inmediatamente con las moléculas de disolvente formando iones reactivos.



## Introducción

3) Los iones reactivos reaccionan (por transferencia de un protón) con las moléculas del analito formando  $(M+H)^+$  en modo positivo o  $(M-H)^-$  en modo negativo.

Como características generales, utiliza un flujo de inyección grande (0.2 - 2.0 mL/min) y se aplica a moléculas no polares, compuestos estables térmicamente, normalmente de peso molecular inferior a 1300 uma. Se requiere un gas nebulizador y una descarga de corriente para producir la ionización (APCI)

### 2.2. Partes básicas de un espectrómetro de masas

Cuando los iones atraviesan un campo magnético o eléctrico, su movimiento depende de su relación  $m/z$ , lo que constituye el principio de separación de iones en MS. El analizador de masas cuadrupolar, que es el más empleado en los laboratorios clínicos, fue desarrollado simultáneamente al cuadrupolo de atrapamiento de iones, por el tercer premio Nóbel pionero en espectrometría de masas, W Paul.<sup>24,25</sup> Un cuadrupolo es un filtro de masas que consta de 4 cilindros metálicos paralelos y equidistantes (Figura 6). Cada par de cilindros opuestos está conectado eléctricamente. Al par de cilindros colocados en diagonal se le aplica un voltaje de corriente continua (DC) de igual magnitud pero signo contrario, superpuesto con un voltaje de corriente alterna de radiofrecuencia (RF). Como resultado, se obtiene un campo eléctrico que origina el movimiento de los iones en la dirección  $z$  (que va desde la fuente al detector) pero con una trayectoria oscilatoria simultánea en el plano  $x-y$ . La amplitud de la oscilación sólo depende de la relación  $m/z$  y puede ser controlada modificando los voltajes de DC y RF en una proporción prefijada.

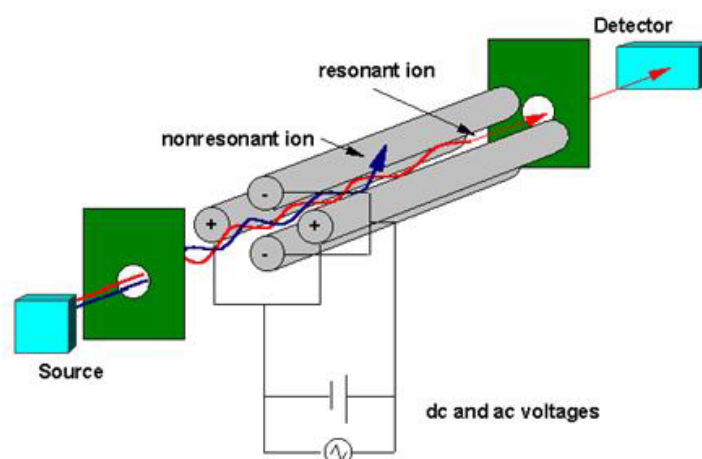


Figura 6. Esquema de un analizador de masas cuadrupolar

## ***Introducción***

Así, el movimiento de los iones dependerá de los campos eléctricos de modo que sólo los de una determinada relación  $m/z$  estarán en resonancia y por tanto pasarán a través del detector. Los valores  $m/z$  que no estén en resonancia con dicha trayectoria chocarán con los cuadrupolos y no se detectarán. El rango de masas y la resolución del instrumento quedan determinados por la longitud y el diámetro de los cilindros.

En los laboratorios actuales, los espectrómetros de masas cuadrupolares generalmente están acoplados a cromatografía de gases o cromatografía líquida para componer un sistema de cribado con alto rendimiento. Pero los cuadrupolos también pueden configurarse en tándem para realizar estudios de fragmentación. El más habitual es el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QQQ),<sup>26</sup> fundamento de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

El espectrómetro de masas de triple cuadrupolo consta de tres cuadrupolos dispuestos en línea recta (Figura 7). En el primer cuadrupolo (Q1) se selecciona el ion analito de interés (habitualmente denominado ion precursor) por su masa y se le pone en contacto con un gas de colisión, generalmente Argon, en un segundo cuadrupolo (Q2), sometido únicamente a RF, que se usa como celda de colisión para producir la fragmentación del ion precursor. Este proceso recibe el nombre de disociación inducida por colisión (CID). Los iones “hijos” resultantes de la CID están relacionados con la estructura molecular del ion precursor y se escanean en el tercer cuadrupolo (Q3) que será el que proporciona la información estructural de los iones moleculares.

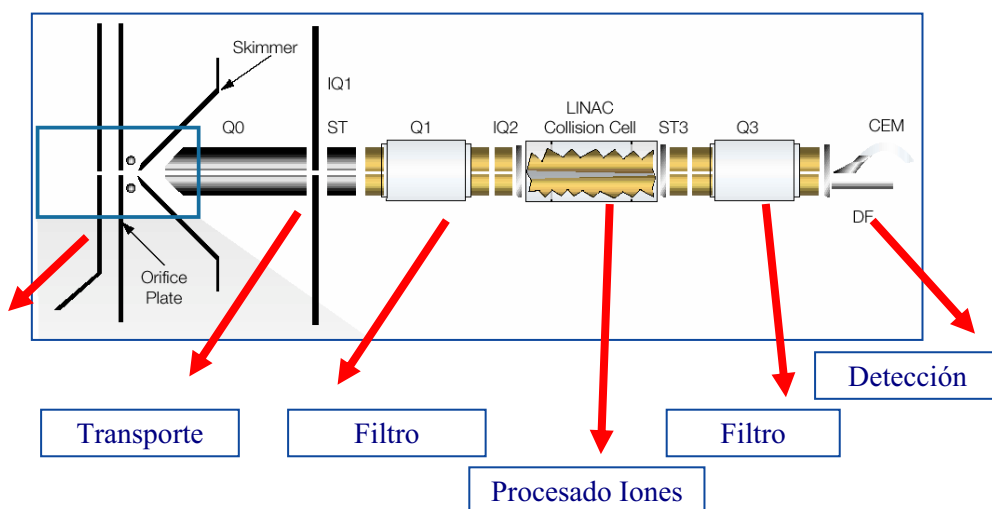
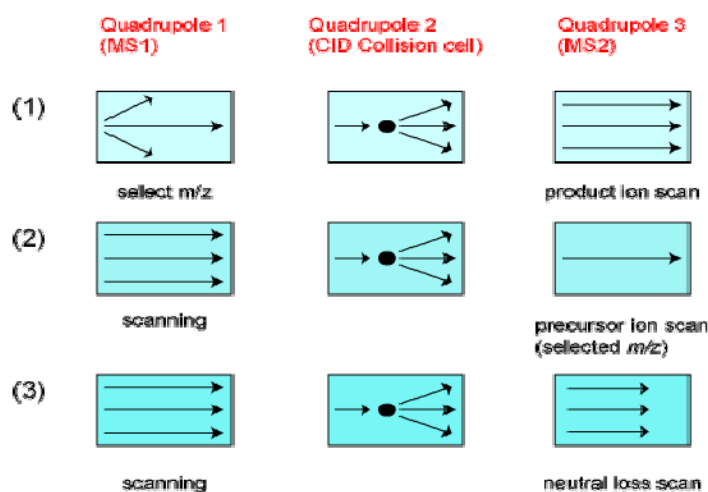


Figura 7. Esquema de un analizador de masas de triple cuadrupolo

### 2.3. Tipos de experimentos en MS/MS (modos de adquisición de datos)

En un espectrómetro de triple cuadrupolo, pueden llevarse a cabo diversos tipos de experimentos. En la Figura 8 se esquematizan los 3 experimentos MS/MS más frecuentes.<sup>27</sup>

(1) Escaneo del ion producto (Product ion scan). En este caso, Q1 permanece constante permitiendo el paso de un único ion precursor de determinada relación  $m/z$  y Q3 escanea los diferentes productos iónicos originados por CID en Q2 - celda de colisión, donde por interacción con un gas de colisión se fragmenta el ion precursor. Este modo puede emplearse para el estudio de estructuras moleculares, como la secuenciación de los aminoácidos de una molécula peptídica. También se emplea este modo de adquisición durante la validación de métodos y para el estudio de hallazgos inesperados en un cribado neonatal.



**Figura 8. Esquema de los principales modos de adquisición de datos en MS/MS**

(2) Escaneo del ion precursor (Precursor ion scan). Q1 escanea sobre un rango de posibles iones precursores mientras Q3 permanece estático enfocando un único ion producto resultante de la CID de una determinada clase de iones precursores. Este modo proporciona un espectro de iones precursores que dan lugar a un ion producto particular. Por ejemplo, una relación  $m/z$  de 85 es un ion fragmento común de todos los iones precursores de las acilcarnitinas butiladas (C2-C18).<sup>28</sup>

(3) Escaneo de pérdida neutra (neutral loss scan). Tanto Q1 como Q3 escanean conjuntamente a una diferencia en la relación  $m/z$  constante. Este modo se utiliza para monitorizar la pérdida de un fragmento neutro para una clase de moléculas obtenidas por CID. Por ejemplo, hay una pérdida neutra de  $m/z$  102 a partir de la mayoría de los aminoácidos butilados y de  $m/z$  119 a partir de la ornitina y la citrulina.<sup>29</sup>

Existe un cuarto modo de adquisición, la monitorización de reacción múltiple (MRM). En este modo, tanto Q1 como Q3 están estáticos para un predeterminado par de iones precursor y producto. De esta forma se consigue la mayor especificidad y sensibilidad y se utiliza muy frecuentemente en procedimientos de cuantificación por ESI-MS/MS.

### **2.4. Análisis cuantitativo**

En ESI-MS, la señal del ion es proporcional a la concentración del analito e independiente de la velocidad del flujo y el volumen inyectado para la introducción de la muestra.<sup>30</sup> Habitualmente, la señal es lineal desde el límite de detección, que suele ser del orden de pmol/L, hasta una concentración de analito en torno a 10  $\mu$ mol/L.

Para el análisis cuantitativo, es importante incorporar un estándar interno al procedimiento, que compense las pérdidas producidas durante la preparación de la muestra y la variabilidad en la sensibilidad de la detección del sistema MS. El estándar interno debe tener estructura similar a la del analito por lo que, en la práctica, lo ideal es sintetizarlo por incorporación de isótopos estables al analito de interés. Por ejemplo, para la cuantificación de carnitina libre ( $m=162$ ), se puede emplear como estándar interno uno de  $m=165$ , que contenga tres átomos de deuterio reemplazando a 3 de hidrógeno. En caso de que no se disponga de un estándar interno ideal, pueden emplearse moléculas de estructura similar.

Otro aspecto crítico en ESI-MS/MS cuantitativa es la supresión de la ionización debida a la interferencia de la matriz de la muestra. Una muestra biológica daría señales de ionización significativamente inferiores a una solución estándar pura con cantidades similares de analito. Esto es debido a las altas concentraciones de sustancias no volátiles presentes en las muestras biológicas, como lípidos y sales. Para evitar interferencias por efecto matriz, se requieren procesos de purificación, como extracción líquido-líquido o en fase sólida. Sin embargo, estos procesos son laboriosos, lentos y pueden tener baja recuperación. Alternativamente, se pueden emplear columnas de cromatografía líquida cortas y aplicar HPLC para separar compuestos no volátiles previamente al experimento de MS/MS.

### ***3. Aplicaciones clínicas del ESI-MS***

En general, la MS/MS constituye un método de elección para analizar compuestos que cumplan las siguientes características:

- Que no sea posible generar anticuerpos suficientemente específicos para desarrollar un inmunoensayo (ej: aminos biogénicos, como las catecolaminas; vitaminas;<sup>31</sup> porfirinas y sus precursores; metabolitos endógenos como la dimetil arginina asimétrica (ADMA);<sup>32</sup> 17- $\alpha$ -OH-progesterona;<sup>33</sup> dihidrotestosterona; metabolitos conjugados de hormonas esteroideas).
- Que se desee cuantificar simultáneamente varios compuestos relacionados en un mismo análisis (Ej. fármacos de frecuente administración conjunta, como el sirolimus y el tacrolimus<sup>34</sup> o un compuesto activo junto con un metabolito activo, como el itraconazol y el hidroxitraconazol, o una hormona junto con su pro-hormona, como el cortisol y la cortisona<sup>35</sup>).

#### **3.1. Cribado de los errores congénitos del metabolismo**

Una de las aplicaciones clínicas más comunes de la ESI-MS es el cribado de los errores congénitos del metabolismo (ECM).<sup>36</sup> Los pacientes con ECM poseen rutas metabólicas defectuosas que conducen a la acumulación de metabolitos tóxicos o a la deficiencia de metabolitos vitales para la homeostasis. Muchos de estos defectos tienen serias consecuencias clínicas, incluidos el retraso mental de moderado a severo, discapacidad física, e incluso la muerte. El diagnóstico y tratamiento precoz de algunos de estos trastornos ha demostrado ser una alternativa muy eficaz en la prevención de las consecuencias clínicas. Los problemas asociados a sistemas incompletos de cribado, que tradicionalmente se limitaban a la fenilcetonuria (PKU) y el hipotiroidismo neonatal, incluyen la laboriosidad de manejo de las muestras, prolongados tiempos de respuesta, elevado número de resultados falsamente positivos y gran cantidad de enfermedades no introducidas en el cribado. El fundamento de la ESI-MS hace de éste el método más adecuado para medir la misma clase de biomoléculas que compartan una estructura similar, y la capacidad del MS/MS hace innecesarios procedimientos tediosos y complicados de pretratamiento de las muestras. Por estos motivos, desde los inicios de los años 1990, el

## ***Introducción***

empleo de la ESI-MS/MS ha revolucionado el campo del cribado neonatal de ECM en muchos países desarrollados. Sin embargo, no hay que olvidar que el uso de una plataforma múltiple de esta naturaleza es un reto y requiere no sólo un gran entrenamiento analítico sino también para la apropiada interpretación postanalítica de perfiles complejos de metabolitos, algunos de los cuales pueden involucrar hasta 15 marcadores y ratios en el mismo perfil. La variabilidad a nivel de la cuantificación también es característica de estos métodos, puesto que podemos encontrarnos con concentraciones informativas que comprendan 4 órdenes de magnitud (desde 0.1 hasta 1000  $\mu\text{M}$ ) en diferentes patologías.

### **3.2. Cribado neonatal de trastornos del metabolismo de aminoácidos y ácidos grasos**

En 1997, Rashed et al<sup>37</sup> describieron un método de detección múltiple para la cuantificación de aminoácidos y acilcarnitinas en muestras de sangre seca del recién nacido recogida en papel. Este método se está incorporando paulatinamente en los programas de cribado neonatal de diversos países de Norte América<sup>38,39</sup> de Europa<sup>40</sup> y de Australia, incluyendo básicamente perfiles para aminoácidos y acilcarnitinas. Mediante esta alternativa, se puede efectuar el cribado de cientos de muestras diarias. El empleo de microplacas permite procesar tandas de muestras de manera automatizada, incluyendo las etapas de muestreo de la sangre recogida sobre papel, extracción y derivatización de analitos y muestreo para el análisis por ESI-MS/MS.

El perfil de aminoácidos permite detectar la mayoría de las aminoacidopatías, como fenilketonuria, enfermedad de orina con olor a jarabe de arce, homocistinuria, la tirosinemia, la citrulinemia, la argininemia, etc.

La medida de hexosas monofosfato en general, y de la galactosa-1-fosfato entre ellas, permite el cribado de la galactosemia.

En el pasado, el cribado de PKU requería muestras de sangre recogidas a partir del quinto día de vida, de modo que se hubiera acumulado suficiente fenilalanina para ser detectada por el poco sensible test cualitativo o semicuantitativo de inhibición bacteriana de Guthrie. Actualmente, la medida del cociente Phe/Tyr mediante ESI-MS/MS puede realizarse con

## ***Introducción***

sensibilidad y especificidad suficientes a partir del primer día de vida, sobre muestras de sangre impregnada en papel<sup>41,42</sup>.

El cribado de los defectos de la oxidación de ácidos grasos se realiza fundamentalmente mediante el análisis de acilcarnitinas.

Algunos ejemplos de enfermedades detectables mediante este sistema son: déficit de acil-coA-deshidrogenasa de cadena media o muy larga, acidemias glutáricas de tipo I y II, déficit de carnitina palmitoil transferasa de tipo II y de translocasa, déficit primario de carnitina, acidemia isovalérica, déficit de 2-metilbutiril coA deshidrogenasa, y déficit de proteína trifuncional y de acil-coA-deshidrogenasa de cadena larga.

Recientemente, se han empleado métodos de cribado para el estudio de potenciales ECM en casos de muerte súbita del recién nacido.<sup>43</sup>

Dadas las severas discapacidades que pueden evitarse mediante la aplicación de estos programas de cribado, resultan coste-efectivos a pesar de que sea necesario realizar cientos de análisis para detectar un niño afectado.

### **3.3. Cribado neonatal de galactosemia**

La galactosemia es un ECM que, en algunas de sus formas, comporta riesgo para la vida y se puede manifestar con síntomas severos en el periodo neonatal. Estas formas suelen estar originadas por el déficit de la enzima galactosa-1-fosfato uridil transferasa. La galactosa derivada de la lactosa contenida en la leche y sus derivados se acumula en sangre conduciendo a altas concentraciones intracelulares de galactosa-1-fosfato, producto tóxico para diferentes tejidos, especialmente el hígado, cerebro y túbulos renales. Las manifestaciones clínicas (ictericia, vómitos, diarrea y letargia) aparecen en los neonatos al poco tiempo de comenzar la alimentación con leche, pudiendo progresar a coma y muerte por septicemia o fallo hepático o renal. El tratamiento precoz con una dieta libre de galactosa remite los síntomas en 1 – 2 semanas. Se ha desarrollado un método ESI-MS/MS para la medida de hexosas-monofosfato en sangre impregnada sobre papel como marcadores de galactosa-1-fosfato<sup>44</sup>. El procedimiento es sencillo y no requiere derivatización de la muestra. Se ha descrito una sensibilidad diagnóstica y una especificidad del 100% para 12 pacientes entre 2055 controles.



### **3.4. Cribado neonatal de enfermedades hepatobiliares colestásicas**

En la ictericia neonatal prolongada, es importante diagnosticar la presencia de enfermedad hepatobiliar colestásica como la atresia biliar extrahepática, una condición que causa gran morbi-mortalidad. Se ha desarrollado un método ESI-MS simple y eficaz para la medida de ácidos biliares en sangre en papel, que podría permitir el cribado de las enfermedades hepatobiliares colestásicas.<sup>45,46</sup> Sin embargo, la discriminación de las concentraciones de ácidos biliares conjugados entre los pacientes y la población general es insuficiente para que este método constituya por sí solo una alternativa válida. El principal motivo es que los recién nacidos de bajo peso sin patología pueden presentar también concentraciones significativamente altas de ácidos biliares, lo que afecta a la especificidad del método. Además, también se observan incrementos significativos tras la alimentación, por lo que debe realizarse una toma de muestra en el momento adecuado para mejorar la utilidad diagnóstica.

### **3.5. Cribado de enfermedades peroxisomales**

Los peroxisomas son organelas intracelulares responsables de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga y ramificada. Las enfermedades peroxisomales son un grupo heterogéneo de ECM caracterizadas por una actividad peroxisomal impedida, reducida o totalmente ausente. Algunos ejemplos incluyen el síndrome de Zellweger, la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X, el déficit de acil-coA oxidasa, el déficit de proteína bifuncional y el déficit de tiolasa peroxisomal. Los pacientes que sufren de estos trastornos pueden tener incrementos anómalos en suero de ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA), así como de ácido pristánico o titánico. Se han utilizado tediosos métodos de GC/MS para estos diagnósticos. Se ha descrito un método rápido por ESI-MS/MS para el cribado de enfermedades peroxisomales.<sup>47</sup> Los VLCFA (C20: Ácido eicosanoico, C22: ác. docosanoico, C24: ác. tetracosanoico y C26: ác. hexacosanoico) han de transformarse en ésteres dimetilaminoetilicos. La purificación de las muestras y la derivatización son relativamente simples en comparación con los tradicionales métodos de GC/MS. Dado que la última etapa de la biosíntesis de ácidos biliares tiene lugar en los peroxisomas, se ha propuesto otro método de cribado de enfermedades peroxisomales basado en HPLC/ESI-

## ***Introducción***

MS/MS para los ácidos biliares C27 y C29 conjugados en plasma que tampoco requiere derivatización y es similar al descrito.

### **3.6. Cribado de trastornos del metabolismo de purinas y pirimidinas**

Los errores congénitos del metabolismo de purinas y pirimidinas tienen una gran variedad de presentaciones clínicas, como son gota, anemia, inmunodeficiencia, cálculos renales, convulsiones, retraso mental, autismo y retraso en el crecimiento. El diagnóstico se basa en la presencia de metabolitos anormales o la ausencia de metabolitos normales en suero, orina o glóbulos rojos. Se ha desarrollado un método de cribado por HPLC/ESI-MS/MS para la cuantificación de 17 purinas y pirimidinas en orina o en orina impregnada en papel con un tiempo de respuesta de 15 minutos por muestra.<sup>48</sup>

### **3.7. Cribado de la hiperplasia adrenal congénita**

Una de las razones que explican la escasa implementación del cribado neonatal de la hiperplasia adrenal congénita es que los inmunoensayos empleados para detectar concentraciones elevadas de 17-hidroxiprogesterona presentan la limitación de una especificidad analítica muy baja. Para reducir el elevado número de falsos positivos, se ha descrito el análisis combinado por MS/MS de 17-hidroxiprogesterona, androstendiona y cortisol en sangre seca en papel.<sup>49</sup> Mediante esta alternativa se reduce casi un 90% de los falsos positivos. Una posibilidad es efectuar este análisis como método confirmatorio de los resultados positivos obtenidos por métodos convencionales, de modo que se eviten seguimientos innecesarios.

### **3.8. Identificación y cuantificación de variantes de hemoglobina**

Desde el primer informe sobre el éxito en la medida de grandes biomoléculas por ESI-MS, se ha producido una revolución en la identificación de moléculas proteicas en investigación bioquímica. En el laboratorio clínico, la cuantificación de glicohemoglobina (GHb) constituye una herramienta útil para la monitorización del control de la glucemia en el paciente diabético. La tecnología que se ha implantado como método de referencia es la ESI-MS. Adicionalmente, las variantes de hemoglobina han de ser identificadas para la

## ***Introducción***

investigación de la anemia hemolítica, la metahemoglobinemia, la anemia falciforme y la talasemia. Ocasionalmente, estas variantes se detectan incidentalmente por su interferencia en la determinación de la GHb. ESI-MS constituye la técnica de elección para una rápida y sistemática aproximación a la caracterización definitiva de las variantes de Hb.

### **a. Cuantificación de glicohemoglobina**

La GHb es el producto de la glicación irreversible no enzimática de la hemoglobina. El porcentaje de GHb representa la integración del promedio de glucosa plasmática del paciente a lo largo de la vida media de los eritrocitos (2-3 meses). Se ha empleado para monitorizar a los pacientes diabéticos durante muchos años. Es conocido que en los pacientes diabéticos un mejor control de la glucemia se asocia con un descenso del desarrollo y/o progresión de complicaciones. La especie predominante de la GHb es la HbA1c y se mide en los laboratorios clínicos por HPLC con columnas de intercambio iónico o de afinidad o bien mediante inmunoensayos automatizados.

La mayoría de estos métodos tienen eficacia y precisión aceptables. Sin embargo, presentan interferencias por variantes de Hb. Existe considerable confusión acerca de la exactitud de los diferentes métodos debido a la falta de estandarización internacional. El principal inconveniente ha sido la falta de entendimiento de la naturaleza específica de la HbA1c. El empleo de ESI-MS elimina este problema.

El método desarrollado por primera vez por HPLC/ESI-MS para la cuantificación de HbA1c requería una digestión con endoproteinasa Glu-C durante toda la noche, seguida de una separación de los péptidos por HPLC. Para calcular el porcentaje de HbA1c de la muestra se empleaban las intensidades de la señal ESI de los hexapéptidos N-terminales beta-específicos de Hb0 y HbA1c.<sup>50</sup> Este método fue adaptado como referencia por la IFCC.<sup>51</sup>

Diversas modificaciones de este método permitieron su adaptación a los laboratorios clínicos. La separación de los péptidos mediante HPLC en fase reversa llevaba 24 min. Este tiempo se redujo a 8 min empleando un gradiente de fase móvil.<sup>52</sup> Para mejorar la especificidad de la medida se empleó una adquisición de la señal mediante monitorización de reacciones múltiples. La precisión se mejoró utilizando las señales de intensidad de iones peptídicos cargados tanto con una como con dos cargas. El coste se redujo

## ***Introducción***

introduciendo una preparación de endoproteinasa Glu-C inmovilizada. Este método consiguió eliminar la interferencia por variantes de Hb,<sup>53</sup> sin embargo aún dista de introducirse en la práctica clínica.

Como método alternativo, se ha desarrollado también un ESI-MS en el que la muestra de sangre total se diluye 1:500 antes de analizar por ESI-MS las cadenas intactas de Hb. En los espectros de masas resultantes, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de globina aparecen con pesos moleculares de 15126.4 y 15867.2 respectivamente. Un incremento de masa de 162 Da se asigna a la adición de una molécula de glucosa (masa: 180 Da) con pérdida de una molécula de agua (-18 Da). Las ventajas de este método son la simplicidad y la rapidez, con tiempos de análisis de 3 min por muestra, y la sencilla automatización. Además, no le afectan las variantes de Hb dado que las cadenas de globina y sus especies glicosiladas pueden medirse fácilmente. La evaluación de este método, tras un periodo de trabajo de 4 meses, lo hace comparable en valores de referencia con el método de HPLC de intercambio iónico, con imprecisiones inter-ensayo entre 1.6 y 5%<sup>54</sup>.

### **b. Identificación de variantes de hemoglobina**

La electroforesis y la HPLC automatizada son actualmente los principales métodos empleados en los laboratorios clínicos para la identificación de variantes de Hb. Sin embargo, estos métodos no proporcionan una caracterización definitiva de dichas variantes, especialmente aquellas con sustitución de aminoácidos que no suponen cambio en la carga total de la molécula de Hb. En el pasado, la caracterización definitiva de las variantes de Hb requería laboriosos procedimientos de laboratorio que tardaban días e incluso meses en completarse. Recientemente, se ha descrito una estrategia para la caracterización definitiva y rápida de estas variantes, mediante ESI-MS. Identifica el 95% de las variantes de Hb en más de 250 muestras con un tiempo de respuesta inferior a 2 días por muestra. El procedimiento incluye los siguientes pasos:

- Perfil de peso molecular de las cadenas intactas de globina  $\alpha$  y  $\beta$  por ESI-MS directo en una muestra de sangre total diluida 1:500. Se pueden detectar variantes de Hb con diferencias en peso molecular de más de 6 Da, comparativamente con las cadenas de globina nativas.

## ***Introducción***

- Digestión con tripsina toda la noche para investigar la sustitución de aminoácidos en las variantes de Hb. ESI-MS del producto digerido por tripsina puede identificar el péptido específico portador del aminoácido sustituido.
- La identificación por ESI-MS/MS del péptido diana proporciona la secuencia de aminoácidos del mismo y por tanto la posición del aminoácido sustituido.

### **3.9. Monitorización de fármacos**

Las técnicas de HPLC convencional son en general altamente específicas, pero incluso ante un pico simétrico, debe sospecharse siempre de la posibilidad de que coeluyan metabolitos de un fármaco con el propio compuesto diana. Es muy poco frecuente disponer de estos metabolitos como sustancias puras para poder realizar un estudio concluyente de especificidad analítica en métodos como HPLC o inmunoensayo. Sin embargo, mediante MS/MS, la probabilidad de que una señal de monitorización de una reacción múltiple sea generada por un metabolito inactivo del fármaco considerado, por otro fármaco o por un compuesto endógeno, aunque existe, es muy baja. De ahí que la técnica MS/MS sea ideal para la monitorización de fármacos.

### **3.10. Limitaciones de MS/MS**

Los sistemas MS/MS aún presentan algunas limitaciones en cuanto a sensibilidad. En general, para la mayoría de los analitos es posible alcanzar límites de detección de 1 µg/L, lo que es suficiente para la monitorización de la mayoría de fármacos y el análisis de hormonas importantes. Los pretratamientos de muestra que incluyen una etapa de concentración (ej. evaporación) pueden mejorar los límites de detección. Sin embargo, compuestos como las metanefrinas plasmáticas son aún un desafío para el desarrollo de métodos MS/MS.

La especificidad de MS/MS es, en principio, muy alta, pero debe tenerse en cuenta la posibilidad de transformación del compuesto en la fuente de ionización, así como la posible existencia de metabolitos activos e inactivos de un fármaco que, teniendo la misma masa molecular, presenten grupos funcionales en diferentes posiciones de modo que dichos isómeros compartan idénticos fragmentos en el proceso de desintegración inducida

## ***Introducción***

por colisión. Las macromoléculas con cargas múltiples de una muestra pueden generar una gran variedad de iones producto cargados y potencialmente pueden coincidir con la transición MRM de un analito de interés. Sin embargo, en estos casos, acoplando una cromatografía adecuada pueden generarse picos distinguibles de macromoléculas con carga múltiple.

No todos los compuestos de baja masa molecular son siempre ionizables a presión atmosférica. Los compuestos apolares se ionizan con mayor eficacia mediante APCI que mediante ESI. Sin embargo, los sistemas actuales permiten pasar de APCI a ESI en minutos. Con todo, en ciertos casos no se consigue una ionización suficiente para cuantificar los niveles de concentración naturales. Para cuantificar ácido metilmalónico, por ejemplo, se requiere una derivatización que proporcione suficiente ionización. En otros compuestos, la ionización es eficaz pero la desintegración inducida por colisión no genera iones producto característicos para MRM, especialmente si predominan los aductos de sodio del analito correspondiente.

En MS/MS, algunas características técnicas, como la arquitectura específica de la fuente de ionización, los parámetros instrumentales (en torno a 20) y las potenciales fases móviles tienen gran impacto en la ionización (por la posible formación de aductos) y la desintegración. Por este motivo es cuestionable que se puedan desarrollar librerías de espectros similares a las disponibles para GC-MS, que permitirían la identificación de compuestos desconocidos. La posibilidad de desarrollar un método de MS/MS depende asimismo de la disponibilidad de estándares internos adecuados, los cuales tampoco existen actualmente para todos los analitos de interés.

### **3.11. Técnicas complementarias a la MS/MS y nuevas aplicaciones en desarrollo**

La principal técnica que se está implementando en investigación como una herramienta de gran versatilidad y potencial utilidad clínica en proteómica es el MALDI-TOF. Consiste en la combinación de una técnica de ionización por láser (MALDI: matrix-assisted laser desorption ionization) de muestras sólidas, como suero seco impregnado en papel, con una técnica muy potente para macromoléculas, como es la espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF). Empleando un software adecuado, es posible la secuenciación de

## ***Introducción***

proteínas y de ADN amplificado mediante esta técnica (si bien, en principio, también sería posible mediante ESI-MS). En los instrumentos denominados de atrapamiento de iones, que comparten los fundamentos de la ionización a presión atmosférica con el MS/MS, los iones precursor y producto se mantienen en un campo de radiofrecuencia. La desintegración de los iones seleccionados se realiza de manera discontinua mediante impulsos de radiofrecuencia y, por tanto, es posible obtener varias generaciones de iones producto en un tiempo MS<sub>n</sub>. Esto aporta una mayor especificidad a pesar del menor coste del equipo, en comparación con MS/MS. Sin embargo, la forma discontinua en que se genera la señal en los instrumentos de ion-trap limitan el número de datos puntuales generados para un pico, lo que reduce precisión al ensayo.

A excepción del hipotiroidismo congénito, los métodos basados en MALDI-TOF y MS/MS pueden cubrir virtualmente todas las patologías incluidas en los paneles de cribado neonatal tradicional y ampliado y han sentado las bases para la inclusión de otras enfermedades. Por ejemplo, Li et al<sup>55</sup> describieron en 2004 un método nuevo para la determinación directa de galactocerebrósido  $\beta$ -galactosidasa en sangre neonatal en papel y sugirieron la aplicación del mismo para la detección de la enfermedad de Krabbe. La rápida expansión que está experimentando la intervención terapéutica disponible para el tratamiento de las enfermedades lisosomales y la incidencia global de éstas, que se aproxima a 1:5000 recién nacidos, está provocando que estos nuevos métodos se incorporen al cribado tras una fase de validación clínica prospectiva por medio de estudios piloto multicéntricos.

El déficit de la proteína citrina, una proteína mitocondrial aspartato-glutamato transportadora, codificada por el gen SLC25A13, produce una forma de citrulinemia de tipo II con debut en la edad adulta. Estudios retrospectivos de casos diagnosticados en edad adulta permitieron la caracterización de este déficit,<sup>56</sup> cuyas alteraciones incluían elevación de metionina, fenilalanina y galactosa u otras combinaciones que habían sido despreciadas en el momento del análisis como artefactos inespecíficos de la dieta.

Otras patologías detectables por MS/MS incluyen la encefalopatía etilmalónica, el déficit de isobutiril-CoA deshidrogenada y el déficit de acil-CoA deshidrogenasa de cadena ramificada o corta.<sup>29</sup>

#### ***4. Cribado metabólico neonatal ampliado usando Espectrometría de Masas en Tándem***

##### **4.1. Alteraciones metabólicas estudiadas**

Una enfermedad congénita se caracteriza por el mal funcionamiento de un enzima o incluso su deficiencia, como consecuencia de un defecto hereditario muchas veces recesivo. Debido al bloqueo que se produce en la transformación química, hay productos celulares que dejan de ser sintetizados o catabolizados, de forma que se acumula una cantidad excesiva de otro producto metabólico que lesiona los tejidos, o impide que ciertos materiales intracelulares atraviesen la membrana celular. Tiene lugar un desajuste del metabolismo que el propio organismo trata de solventar activando rutas metabólicas secundarias que provocan la formación de metabolitos anormales que son tóxicos para el propio organismo, provocando una alteración del cerebro y del sistema nervioso central que está acabando de madurar en los días inmediatamente posteriores al nacimiento. Por tanto, estas alteraciones metabólicas, si no se tratan en los primeros días de vida, provocan daños irreversibles.<sup>57</sup>

Entre los distintos trastornos metabólicos que pueden ser analizados se encuentran los asociados con el metabolismo de aminoácidos y acilcarnitinas, así como alteraciones en la oxidación de ácidos grasos (FAO) y trastornos del metabolismo de ácidos orgánicos.<sup>58</sup>

Con la espectrometría de masas en tándem es posible realizar el análisis simultáneo de los metabolitos causantes de dichas enfermedades, lo que proporciona un diagnóstico definitivo temprano que permite instaurar un tratamiento inmediatamente a fin de evitar posibles secuelas irreversibles y a su vez traumáticas, como es el daño cerebral.

En la Tabla 1 se resumen las principales enfermedades cuyo diagnóstico es posible mediante MS/MS<sup>59,60</sup>.



## Introducción

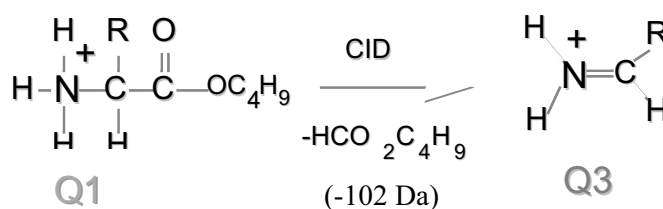
Trastornos asociados con el metabolismo de aminoácidos	Metabolito indicador
Fenilcetonuria	Phe
Jarabe de arce	Leu, Ile, Val
Tirosinemia (I, II)	Tyr
Homocistinuria	Met
Citrulinemia	Citrulina (Cit)
Aciduria arginosuccínica	Citrulina (Cit)
Hipermetioninemia	Met
<b>Defectos FAO</b>	
Def. deshidrogenasa acil-CoA de cadena muy larga. (VLCAD)	C14:1, C14, C16
Def. deshidrogenasa acil-CoA de cadena larga. (LCHAD)	C16OH, C18:1OH, C10OH, C12OH, C14OH, C18OH
Def. deshidrogenasa acil-CoA de cadena media. (MCAD)	C8, C10, C10:1, C6
Def. deshidrogenasa acil-CoA de cadena corta. (SCAD)	C4
Múltiple deficiencia de deshidrogenasa Acil-CoA (MADD)	C10, C4, C8, C5, C8:1, C12, C14:1
Deficiencia de la carnitina palmitoil transferasa (CPT II)	C18:2, C18:1, C18, C16, C12, C10, C14,
Defecto de la translocación de Carnitina/Acilocarnitina	C16, C18:1, C18
<b>Acidurias orgánicas</b>	
Acidemia isovalérica	Isovaleril (C5)
Aciduria 3-hidroxi-3-metilglutárica	3-metilglutaril (C6DC), C5OH, C3
Acidemia propiónica	Propionil (C3)
Holocarboxilasa sintetasa, biotinidasa	Propionil (C3), C5OH
Acidemia glutárica tipo I	Glutaril (C5DC)
Acidemia metilmalónica	Propionil (C3), C4DC
Def. de liasa de 3-OH-metilglutarilCoA	C5OH
Def. de carboxilasa 3-metilcrotonilCoA	C5OH
Argininemia	Arginina (Arg)
Hipoglicemia no cetónica	Glicina (Gly)
Hiperornitemia, hipocitriluria	Ornitina (Orn), homocitrulina
5-oxiprolinuria	5-oxiprolina
Def. carnitina palmitoil transferasa (I)	Carnitina libre
Def. isobutiril CoA deshidrogenasa	C4
Def. acetoacetil tiolasa mitocondrial	C5:1, C5OH
Aciduria metilmalónica	C3DC
Def. 2-metilbutirilCoA deshidrogenasa	C5

**Tabla 1. Relación de alteraciones potencialmente detectables en un programa de Cribado Neonatal por Espectrometría de Masas en Tándem**

#### 4.2. Análisis de Aminoácidos por MS/MS

Hay una analogía bastante útil en la estructura de los aminoácidos que permite que cuando se someten a la acción de fuerzas físicas o a choques con otras moléculas se fragmenten de acuerdo con perfiles reproducibles. La MS/MS hace uso de estos perfiles para el desarrollo de métodos de análisis selectivos<sup>39,58,61</sup>

Los aminoácidos extraídos de los discos de sangre son sometidos a una sencilla modificación química, butilación, para poder ser analizados de forma selectiva por MS/MS usando la característica común de que pierden una molécula neutra de 102 Da (NL 102) al chocar con moléculas de un gas en el interior del espectrómetro (Figura 9). De esta forma pueden ser fácilmente medidos la mayoría de los alfa aminoácidos de forma reproducible. Sin embargo, algunos alfa aminoácidos como la cisteína, homocisteína, la lisina o el triptófano no pueden ser medidos fácilmente de esta forma aunque, afortunadamente, tienen menor interés en el cribado neonatal.



**Figura 9. Esquema de la fragmentación de un aminoácido**

La butilación favorece la ionización y, mediante la NL 102, se tiene un registro continuo, a lo largo de todo el rango de masas seleccionado, de aquellos compuestos que se comportan cediendo dicho fragmento de masa 102. Se puede obtener de forma simultánea información del contenido de fenilalanina, tirosina, leucina más isoleucina y metionina fundamentalmente, aunque pueden ser medidos también otros como valina, alanina, prolina, etc.

El perfil completo de aminoácidos de interés en cribado neonatal requiere también algunos aminoácidos básicos como la citrulina, arginina o la ornitina que deben ser medidos mediante otro tipo de MS/MS. Es el conocido como “medida de múltiples iones” (MRM). Para ello, se selecciona la masa de estos aminoácidos, de sus correspondientes derivados marcados isotópicamente y de los fragmentos principales de ambos grupos. Todos ellos

## *Introducción*

son medidos secuencialmente de forma individual. Este tipo de ensayo requiere la optimización de forma individualizada de las condiciones de medida y permite obtener un registro con las intensidades de cada ion.

Los aminoácidos ejercen numerosas funciones en el metabolismo, desde precursores a mediadores o fuente de producción de energía. Muchos de los problemas relacionados con un metabolismo anormal de los aminoácidos conducen a una elevación de la concentración de amonio y, desde la perspectiva del cribado neonatal, hacen que el tiempo sea un factor crítico en la etiología de la enfermedad. Para la mayoría de ellos el metabolismo materno asegura concentraciones de los aminoácidos casi normales pero, tras el nacimiento se manifiestan las alteraciones del metabolismo y con el tiempo y la influencia de la dieta, el metabolismo celular u otros factores externos aparecen las desviaciones de estas concentraciones y a ello añadiremos las derivadas de los mecanismos de compensación.

Es en esta acción precoz englobada en el cribado neonatal, y que depende en sus resultados de pequeños cambios en la dieta o en el momento de la toma de muestra, donde se agradece más el disponer de tecnologías más sensibles y precisas y que permiten una aproximación múltiple, por disponer de varios analitos, al posible problema. En este contexto, la MS/MS destaca como la técnica más eficaz, al permitir detectar las alteraciones en estadios aún más precoces y con prácticamente el 100 % de sensibilidad y fiabilidad.

Esto es muy evidente en el caso de las hiperfenilalaninemias. La MS/MS permite medir la fenilalanina y la tirosina y con ellos su ratio y, aunque otros posibles metabolitos de interés no puedan ser medidos, permite establecer puntos de corte eficaces para la detección no sólo de la fenilcetonuria clásica sino también de las formas benignas, cuyo diagnóstico puede ser de gran trascendencia en los casos de las niñas para evitar futuras hiperfenilalaninemias durante el embarazo. Por otra parte, se evitan muchos de los posibles falsos positivos y negativos al manejar ambos aminoácidos conjuntamente y, además, al disponer de toda la información del perfil global de aminoácidos, se reducen las posibilidades de efectuar una mala interpretación de los resultados, por ejemplo en pacientes sometidos a nutriciones parenterales o con problemas hepáticos.

Mediante MS/MS pueden ser detectadas bastantes aminoacidopatías en periodo neonatal y, en muchos casos, con gran fiabilidad, una vez adquirida la experiencia necesaria para

## ***Introducción***

efectuar una correcta valoración de los resultados. Sin embargo, en el caso de la Tirosinemia tipo I, donde la elevación de la tirosina puede no ser significativa en la etapa neonatal, es difícil garantizar la cobertura de su cribado si no se dispone de un ensayo específico para la succinilacetona.

La incapacidad de la MS/MS para separar isómeros, salvo que se realice una separación cromatográfica previa, o de distinguir entre compuestos de masa molecular coincidente, hace que la información suministrada directamente a partir del cribado neonatal tenga pequeñas limitaciones de cara al seguimiento analítico de algunos pacientes. Un ejemplo típico es el caso de los pacientes con Jarabe de Arce, al aparecer sumadas las concentraciones de leucina, isoleucina y alo-isoleucina y, en este caso, incluso con la hidroxiprolina, por tratarse de moléculas de la misma masa molecular.

Pese a estas limitaciones, la cantidad de información obtenida es de tal envergadura que cabe esperar que en un futuro próximo permita llegar a conclusiones o recomendaciones en campos no directamente relacionados con el cribado neonatal. Tal es el caso de las muy extendidas suplementaciones con aminoácidos que pueden tener efectos adversos sobre la función hepática.

### **4.3. Análisis de Acilcarnitinas por MS/MS**

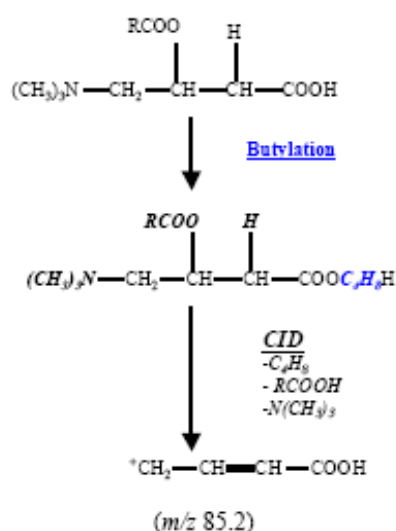
La carnitina (3-hidroxi-4-trimetilaminobutirato) juega un papel importante en el transporte de ácidos grasos a través de la membrana mitocondrial para realizar la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. Cuando los ácidos grasos se unen a la carnitina es posible su transporte a través de la membrana mitocondrial gracias a unas proteínas transportadoras que se encuentran en la membrana de la mitocondria. Una vez en su interior, si todo funciona correctamente, se produce el ciclo de Krebs, generándose dióxido de carbono, agua y energía a partir de los ácidos grasos.<sup>62</sup> El problema surge cuando no es posible la  $\beta$ -oxidación, pues existe alguna deficiencia en un enzima, provocando el aumento de algún intermediario en esta ruta, por lo tanto ese exceso de acilCoA mitocondrial se excreta al exterior, convirtiéndose previamente en acilcarnitina, aumentando estos metabolitos en sangre. La preparación de la muestra es idéntica a los aminoácidos, por lo que pueden ser analizados conjuntamente. La MS/MS puede ser utilizada para medir carnitina libre y acilcarnitinas en el mismo extracto derivatizado obtenido a partir de las muestras de sangre impregnada sobre papel y utilizado para el análisis de aminoácidos. La carnitina libre hace

## Introducción

de transportador, a través de la membrana y hacia el interior de la mitocondria donde tiene lugar la beta oxidación de los ácidos grasos en forma de diferentes acilésteres de carnitina. Las posibles alteraciones de las diferentes etapas de este metabolismo producen una acumulación de tioésteres de CoA y un incremento paralelo de acilcarnitinas que son medidas por MS/MS y por tanto permiten detectarlas.<sup>39,58</sup>

La carnitina libre (C0) y las acilcarnitinas liberan un fragmento común de masa molecular 85 Da (PS 85) cuando son sometidas a choques moleculares dentro de un espectrómetro de masas (Figura 9). Esto permite realizar un experimento donde puede realizarse un registro continuo, en un rango de masas que suele cubrir desde los 200 a los 500 Da, de todos aquellos compuestos que se comportan de esta forma. Como resultado, se obtiene un espectro muy selectivo de acilcarnitinas en sangre, en el que se recogen desde las de 2 hasta las de 20 carbonos, y que cubre, por tanto, los metabolitos de interés: desde los implicados en el déficit de la beta oxidación de los ácidos grasos de cadena corta hasta los de cadena muy larga.

Las acilcarnitinas son butiladas para mejorar la eficacia en su ionización y simultáneamente aumentar la especificidad del ensayo. Este paso es de vital importancia en el caso de las carnitinas con dos grupos ácido y, entre éstas, se encuentran la malonil, metilmalonil y glutarilcarnitina que son marcadores de varias alteraciones.



**Figura 10. Butilación y fragmentación de las acilcarnitinas**

## ***Introducción***

La mayoría de los programas actuales de cribado neonatal ampliado se basan en la combinación del ensayo de NL 102, el de MRM, para los aminoácidos básicos, y el de PS 85, para las acilcarnitinas, realizados de forma secuencial sobre un pequeño volumen de muestra de sangre que ha sido preparada en una placa de microtitulación. Dicha muestra es inyectada, mediante una bomba de HPLC, a un flujo del orden de tan sólo 50 µL/min, lo que permite una adecuada ionización y detección, dentro del espectrómetro de masas en tándem.

### **4.3.1. Deficiencia de la deshidrogenasa acil-CoA de cadena media**

Al igual que la hiperfenilalaninemia en el caso de los aminoácidos, el mejor exponente de las posibilidades que ofrece el análisis de acilcarnitinas, mediante MS/MS, en muestras de sangre impregnada sobre papel, para ampliar el cribado neonatal, es la alteración en el metabolismo de los ácidos grasos de cadena media (MCAD), debida a un déficit en la Acil CoA deshidrogenasa de cadena media. Esta alteración provoca un inesperado aumento en la concentración intramitocondrial de compuestos acilCoA de cadena media (cadenas de carbono de 6 a 10 átomos) que, una vez transformados por las carnitin palmitoil transferasas en acilcarnitinas, son transportados fuera de la mitocondria, pasan a la sangre y son almacenados en el hígado, el riñón o excretados a través de la orina. Esta acumulación en sangre de acilcarnitinas saturadas e insaturadas de cadena media, simultánea a la acumulación de los ácidos grasos del mismo tipo, produce un perfil muy característico cuando es analizada por MS/MS y permite su detección neonatal de forma muy fiable, al ser además una técnica muy sensible para este tipo de compuestos. Paralelamente, se produce la acumulación de los ácidos grasos del mismo tipo, pero éstos son generados de forma muy precoz y prácticamente no presentan interferencias analíticas. Al igual que sucedía con los aminoácidos, los ratios entre las acilcarnitinas de cadena media, la octanoilcarnitina (C8) es la usada habitualmente, y la carnitina libre ó la acetilcarnitina (C2), se convierten en marcadores aún más potentes. Ello se debe a que la formación de grandes cantidades de acilcarnitinas suele provocar la disminución en la carnitina no esterificada y, por tanto, aún en el caso de un déficit severo de carnitina por otras causas, el cociente se mantiene elevado. El uso de ratios como indicadores permite evitar posibles falsos negativos en los resultados y también falsos positivos, porque permite distinguir entre la MCAD y otras alteraciones. Sin embargo, su manejo requiere

## ***Introducción***

experiencia cuando nos encontramos con situaciones intermedias en las cuales la C8 no está muy elevada ó la C2 no está suficientemente baja. Esta última situación se da en el caso de sujetos portadores de dicha alteración o en casos de muestras de sangre mal impregnadas.

Así pues, en el caso de la MCAD haremos uso de varios metabolitos (habitualmente C6, C8, C10 y C10:1) y de los ratios frente a C0, C2 o incluso C16, aunque se considere el C8 como metabolito de referencia. Al igual que sucede en el trabajo con perfiles de aminoácidos, un marcador concreto puede estar relacionado con la presencia de más de una alteración y en este caso tendremos, p.ej, que la C8 puede aparecer elevada también en el caso de una deficiencia múltiple de acil CoA deshidrogenasa (MADD), o al uso de fármacos como el ácido valproico o incluso al uso de dietas o suplementos ricos en ácidos grasos de cadena media (MCT). Será el uso de la información que se deriva de otras acilcarnitinas, el trabajo con perfiles, el que haga posible una interpretación más adecuada por parte del laboratorio, reduciendo así el número de falsos positivos y negativos.

En el contexto de lo expuesto en el párrafo anterior, no parece recomendable el planteamiento de algunos laboratorios de utilizar únicamente un marcador (C8) y su patrón interno, a veces por el imperativo legal de ceñir el cribado a un grupo reducido de enfermedades, que conduciría a la imposibilidad de distinguir entre la MCAD y la MADD.

### **4.3.2. Deficiencia de la deshidrogenasa acil-CoA de cadena muy larga**

La deficiencia de la FAO de cadena muy larga (VLCAD) se caracteriza por la acumulación de acilcarnitinas de ácidos grasos de cadena larga. Se produce una acumulación de aquellas acilcarnitinas con un número de carbonos comprendidos entre 12 y 16. Su acumulación es debida a la deficiencia del enzima deshidrogenasa de acil-CoA de cadena muy larga.

Se produce una elevación muy importante de la tetradecanoilcarnitina (C14) y tetradecenoilcarnitina (C14:1). Otros metabolitos se ven significativamente incrementados, como el palmitoilcarnitina (C16), octadecanoilcarnitina (C18) y octadecenoilcarnitina (C18:1). Al igual que la MCAD, sus niveles máximos se encuentran e los primeros días de vida, descendiendo luego de modo que el diagnóstico se hace más difícil. Así, a los dos días de edad el cociente C14:1/C16 es de 4.8 y se reduce a 1.2 a los 7 días de edad.

### **4.3.3. Deficiencia de la deshidrogenasa acil-CoA de cadena corta**

La deficiencia de la FAO de cadena corta (SCAD) es una enfermedad metabólica en la que hay una acumulación de acilcarnitinas de ácidos grasos de cadena corta, principalmente de butirilcarnitina (C4). También se presenta una excreción elevada de ácidos orgánicos de cadena corta (etilmalónico, ácido metilsuccínico, butirilglicina y butirilcarnitina). Su acumulación se debe a una deficiencia en el enzima deshidrogenasa acil-CoA de cadena corta. En general, no es un desorden muy frecuente dentro de estas enfermedades.

### **4.3.4. Deficiencia de la deshidrogenasa acil-CoA de cadena larga**

La deficiencia de la FAO de cadena larga (LCHAD) se caracteriza por una acumulación de hidroxiacilcarnitinas de cadena larga. Entre ellas, se encuentran la hidroxihexadecanoilcarnitina (C16OH), hidroxiocetadecanoilcarnitina (C18OH). Además, produce una elevación de C16, C14, C14:1 e hidroxitetradecanoilcarnitina (C14OH). En general, el principal marcador de esta deficiencia es la 3-hidroxipalmitoilcarnitina (C16OH), pues es el metabolito que aparece más elevado. El diagnóstico diferencial entre esta deficiencia y la VLCAD es bastante difícil, pues a veces presentan perfiles semejantes.

### **4.3.5. Déficit múltiple acil-CoA deshidrogenasa**

El déficit múltiple (MADD) se caracteriza por una acumulación de acilcarnitinas de cadena corta, media y larga, así como de isovalerilcarnitina (C5) y, con frecuencia, glutarilcarnitina (C5DC). El patrón de metabolitos es variable, pero en general incluye un aumento de C8 y C8:1.

El diagnóstico de esta deficiencia es poco fiable cuando se obtiene por espectrometría de masas en tándem, ya que debido a la ligera elevación de las acilcarnitinas es difícil conocer con seguridad si se trata de esta patología. Siempre habrá que apoyarse en el análisis de ácidos orgánicos para confirmar el diagnóstico.

### **4.3.6. Acidemia metilmalónica**

La acidemia metilmalónica (MMA) provoca una sobreelevación característica de propionilcarnitina (C3). El ácido metilmalónico es un metabolito intermedio en la conversión del ácido propiónico a ácido succínico.<sup>63</sup> Su aumento se debe a la deficiencia de cualquier enzima metilmalónico-CoA mutasa o a defectos en la producción de



adenosilcobalamina, la deficiencia de la vitamina B12, cofactor de la metilmalonil-CoA mutasa.<sup>64</sup>

### **4.3.7. Acidemia propiónica**

La acidemia propiónica (PA) es una metabolopatía que se caracteriza por la deficiencia del enzima propionil-CoA carboxilasa. Al igual que en la MMA, se produce un aumento de C3, con la consiguiente disminución del cociente C3/C2, de modo que la elevación de la propionilcarnitina es muy superior al producto en la MMA.

### **4.3.8. Acidemia glutárica tipo I**

La acidemia glutárica tipo I (GA I) es un desorden metabólico muy infrecuente. El principal marcador es la glutarilcarnitina (C5DC), que se mide frente al estándar interno deuterado C8.<sup>39,58</sup>

La concentración de C5DC varía considerablemente en el período neonatal. Así como otras acilcarnitinas, a medida que pasa el tiempo es más difícil de detectar, por lo que, para su diagnóstico, son extremadamente importante los cocientes C5DC/Ala.<sup>58</sup>

### **4.3.9. Acidemia isovalérica**

Desorden metabólico causado por la deficiencia del enzima deshidrogenasa isovaleril-CoA mitocondrial. Si consideramos un caso patológico de este desorden, nos encontramos con un espectro en el que la señal correspondiente a la isovalerilcarnitina (C5) está muy aumentada, además de existir un moderado aumento de la señal de otras acilcarnitinas de cadena media y larga, como la C8, C8:1, C14 y C16.

Para su diagnóstico, los cocientes C5/acilcarnitina pueden ser de gran ayuda, pero para la confirmación es precisa la realización de un análisis de ácidos orgánicos.

## **Parte experimental**



## **1. Determinación de Acilcarnitinas por Espectrometría de masas en Tándem**

Se plantea la medida de un grupo de compuestos, las AC previamente derivatizadas y convertidas en butilésteres con el fin de bloquear los grupos ácido, cuya ionización va a estar relacionada con los grupos funcionales de que consta y que en este caso conducirá a especies protonadas y por tanto a iones positivos. Se define así pues la primera opción instrumental: ionización positiva en la fuente.

Al tratarse de una familia de compuestos con estructura de base común, con cadenas de entre 2 y 20 átomos de carbono, se plantea el desarrollo de un único experimento que haga uso de sus características comunes de fragmentación y el trabajo en modo barrido entre un rango adecuado de masas. Se opta por un ensayo de registro del conjunto de compuestos que producen al fragmentarse un fragmento de  $m/z$  85.1 Da.

### **1.1. Instrumentación**

La espectrometría de masas en tándem se llevó a cabo con un equipo de triple cuadrupolo ESI-MS/MS API 2000 (Sciex Applied Biosystems, Toronto, Canadá) equipado con una bomba de jeringa integrada para realizar infusiones individuales y una fuente de Turboión Spray. Como gas de colisión y gas cortina se empleó nitrógeno.

Las muestras fueron infundidas acoplando un equipo de HPLC compuesto de un muestreador automático para microplacas y una bomba modelo Series 200 (Perkin-Elmer). Todos los resultados fueron adquiridos con el software Analyst v 1.4 (Sciex Applied Biosystems).

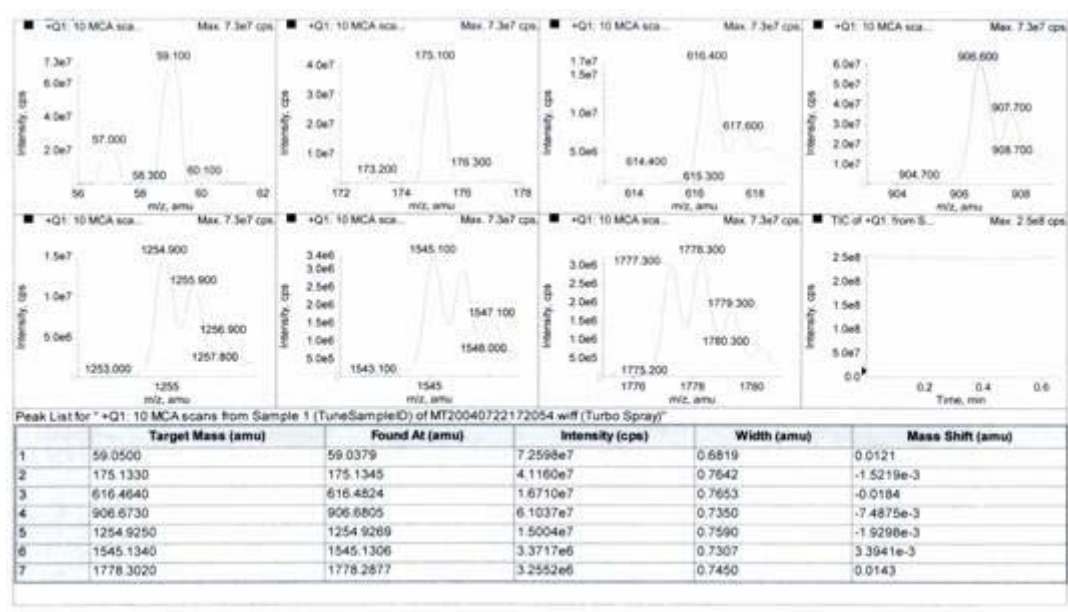
### **1.2. Calibrado del Equipo**

Para la puesta a punto previa del equipo se realiza el calibrado del mismo infundiendo una mezcla patrón de PPG (polipropilenglicol) suministrada por el fabricante. Dicha mezcla permite el calibrado en 7 puntos de modo que se cubra todo el rango de masas de trabajo del instrumento, hasta una  $m/z$  de 2000 Da.

Se infunde dicha mezcla mediante la jeringa integrada en el equipo a un flujo bajo, usualmente 5 o 10  $\mu\text{L}$  por minuto, y se ajustan los voltajes de forma que las masas de las

## Parte experimental

líneas seleccionadas sean ubicadas con un margen de error menor de 0,1 Da y una resolución mejor de  $0.7 \pm 0.1$  Da (ancho del pico al 50% de su altura máxima).



**Figura 11. Registro de los detalles del calibrado para Q1**

En la Figura 11 aparece el espectro típico de calibrado con las 7 masas seleccionadas con las resoluciones y ajustes de masa correspondientes.

El ajuste a los parámetros óptimos puede realizarse de modo manual o automático y teniendo presente siempre que a mayor resolución menor sensibilidad.

El calibrado se comprueba periódicamente y se registran los cambios necesarios.

De igual forma se procede periódicamente al ajuste del voltaje del detector. Para ello se procede al registro en continuo de las respuestas para una línea de masa seleccionada del PPG (habitualmente la de 933 Da) haciendo variar dicho voltaje (Figura 12).

Se considera óptimo el voltaje más bajo que conduce a una diferencia de señal de al menos el 30% respecto a uno de 200 V menos.



**Figura 12. Registro realizado para el ajuste del voltaje del detector (CEM)**

Un punto crítico de ajuste es la posición del capilar de la fuente de ionización. Para su óptima ubicación, la fuente dispone de un tornillo micrométrico que permite ajustar dicha posición y hacerla reproducible. En general se selecciona la posición que produce una mayor señal pero mantiene alejado el cono de ionización del orificio de entrada de los iones producidos al espectrómetro de masas. Es importante evitar esto último pues provoca que se ensucien las partes iniciales del instrumento con el consiguiente efecto de supresión de señal y aumento del ruido de fondo del instrumento.

### **1.3. Estudio y optimización de la Fragmentación**

Al tratarse de un grupo de compuestos similares, se llevó a cabo de forma conjunta para todas las acilcarnitinas.

En la Tabla 2 se recogen todas aquellas que pueden tener interés para la aplicación que nos ocupa. Aparece su masa y la del correspondiente compuesto butilado que es el que se va a registrar. En nuestro caso no incluimos ningún ensayo de MRM adicional.

*Parte experimental*

Relación de Acilcarnitinas de mayor interés				
Nombre	Símbolo	Grupos ácido	Masa ión (MH <sup>+</sup> )	Masa al Butilarse
Libre	CO	1	162.1	218.2
Acetil	C2	1	204.1	260.2
Acirilil	C3:1	1	216.1	272.2
Propionil	C3	1	218.1	274.2
Butiril	C4	1	232.2	288.2
Tigilil	C5:1	1	244.2	300.2
Isovaleril	C5	1	246.2	302.2
3-OH-butyryl	C4-OH	1	248.1	304.2
Hexanoyl	C6	1	260.2	316.3
3-OH-Isovaleril	C5-OH	1	262.2	318.2
Octenol	C8:1	1	286.2	342.3
Octanol	C8	1	288.2	344.3
Nonanol	C9	1	302.2	358.3
Malonil	C3DC	2	248.1	360.2
Decadienol	C10:2	1	312.2	368.3
Decenol	C10:1	1	314.2	370.3
Decanol	C10	1	316.2	372.3
Metilmalonil	C4DC	2	262.1	374.3
Glutaril	C5DC	2	276.1	388.3
Dodecenol	C12:1	1	342.3	398.3
Dodecanol	C12	1	344.3	400.3
3-OH-Dodecanol	C12-OH	1	360.3	416.3
Tetradecadienol	C14:2	1	368.3	424.3
Tetradecenol	C14:1	1	370.3	426.4
Myristoil	C14	1	372.3	428.4
Dehydrosuberil	C8:1DC	2	316.2	428.3
Suberil	C8DC	2	318.2	430.3
3-OH-Tetradecanoyl	C14-OH	1	388.3	444.4
Hexadecenol	C16:1	1	398.3	454.4
Palmitoil	C16	1	400.3	456.4
3-OH-Hexadecanol	C16-OH	1	416.3	472.4
Linoleil	C18:2	1	424.3	480.4
Oleil	C18:1	1	426.4	482.4
Stearoil	C18	1	428.4	484.4
	C18:1-OH	1	442.4	498.4
	C18-OH	1	444.4	500.4
	C20	1	456.4	512.5
	C14DC	2	402.3	514.4
	C20-OH	1	472.4	528.5

**Tabla 2. Relación de AC de mayor interés**

## ***Parte experimental***

Para la optimización de los parámetros instrumentales se realiza la infusión a un flujo constante de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  de una disolución conteniendo una mezcla de acilcarnitinas patrón butiladas previamente. Se determina que los iones precursores estén presentes realizando un barrido en el primer cuadrupolo ( $Q_1$ ) dentro del rango de masas seleccionado que, en este caso, de acuerdo con las masas que aparecen en la tabla anterior, fue de  $m/z$  entre 200 y 550 Da en modo “ $Q_1$  scan mode”. Una vez comprobado que los iones moleculares de los compuestos están presentes, se determina su peso molecular a efectos de verificar los compuestos y poder usar esta información de masa exacta si hubiera lugar en una fase posterior de los ensayos.

Inicialmente, se definen los parámetros de la fuente, fijándose la temperatura del gas auxiliar en 200° C, y de la entrada al equipo: gas cortina (CUR) 30, voltaje de spray para la entrada (IS) 5500 y flujos de gas 1 y 2 (GS1 y GS2). Estos parámetros responden a recomendaciones generales en función de la fase móvil usada, el flujo de entrada desde el HPLC y la mayor o menor dificultad de ionización de los compuestos a estudiar. Una vez efectuada una optimización inicial, no suelen ser críticos, pero son optimizados de nuevo al final.

El siguiente paso es la optimización de los parámetros del equipo vinculados al primer cuadrupolo (potencial de “declustering”, DP, el potencial de enfoque de los iones “focusing potential”, FP, y el potencial de entrada “entrante potential”, EP) para detectar los compuestos con la máxima sensibilidad posible.

Cada molécula presenta parámetros específicos. Cada ión precursor un DP, es decir es un parámetro dependiente de la masa, y situar FP y EP en valores de compromiso válidos para todos los que se van a analizar. En nuestro ensayo se fijó 300 para FP y 10 para EP.

Una solución de compromiso en los experimentos del tipo del que estamos optimizando es hacer una rampa de voltajes a lo largo del tiempo de barrido para DP y en nuestro caso resultó ser la solución óptima con valores entre 30 y 50.

Una vez establecidos los parámetros del primero de los cuadrupolos, se debe ajustar el segundo, que se corresponde con la célula de colisión. Se ajusta aquí el flujo de gas auxiliar que, mediante choques moleculares con las moléculas de nitrógeno, produce la fragmentación de forma que ésta sea máxima para los fragmentos deseados, en este caso máxima intensidad para el de  $m/z$  85.1 y que se obtiene componiendo dicho gas en



## Parte experimental

posición 3 o 4 (unidades arbitrarias). Se registra mediante un proceso de “Product ion scan”.

En el tercer cuadrupolo se registra un barrido de los iones producto, que en el caso de un ensayo de precursores, como es el que nos ocupa, será sólo uno. Se optimizan de nuevo los parámetros para obtener la máxima sensibilidad. Estos son la energía de colisión, CE, y el potencial de salida de la célula de colisión, CXP, ambos específicos para cada ión producto. En este caso se mantuvo fijo el último y se rampeó el CE, buscando mayor eficacia con el aumento de peso molecular, entre 30 y 55 (Tabla 3).

---

### Parámetros generales

Tipo de barrido	Iones precursores
Polaridad	Positiva
Modo barrido	Peek Hopping
Fuente	Turbo spray
Precursores de	85.1 amu
Resolución en Q1	Unidad
Resolución en Q3	Baja
Lecturas	cps
Pausa MR	5 ms
MCA	no
Masa por defecto	110 mmu/100amu
Tamaño ventana	1 amu

### Parámetros dependientes de la fuente

Parámetro	Valores optimizados
Gas cortina (CUR, psi)	40
Voltaje de ión espray (IS, V)	5500
Gas colisión (CAD, psi)	4
Temperatura (°C)	200
Gas de nebulización (Gas 1, psi)	30
Turbo Gas (Gas 2, psi)	40
Resolución	unitaria

### Parámetros Espectrómetro de Masas en Tándem

Barrido	200-550 amu
Tiempo de análisis (segundos)	3
DP	30-50
CE	30-55
Ihe	on
CAD	4
FP	300
EP	10
CXP	3.0

---

**Tabla 3. Parámetros optimizados para la determinación de acilcarnitinas por MS/MS**

#### **1.4. Interferencias**

La especificidad de los métodos de MS-MS está unida al análisis combinado de un ion precursor y uno de sus fragmentos. Aunque esto le confiere una gran especificidad, cada molécula con el mismo peso molecular (PM), si se fragmenta de modo similar, va a constituir una interferencia, denominada isobárica, si se encuentran presentes simultáneamente. Lo mismo cabría decir de los isómeros aunque en el caso de las AC esto apenas tiene trascendencia

En el caso de las acilcarnitinas existen pocas posibilidades de estructuras con el mismo peso molecular y que, por supuesto, una vez butiladas se fragmenten del mismo modo. Aunque son pocas y se trata en general de interferencias sin trascendencia desde el punto de vista diagnóstico, salvo en el caso de la butiril e isobutirilcarnitinas, las posibles interferencias isobáricas se recogen en la Tabla 4.

<b>PM</b>	<b>Molécula 1</b>	<b>Interferencia</b>
288	Butirilcarnitina	Isobutirilcarnitina
302	Isovalerilcarnitina	Metilbutirilcarnitina
318	OH-Isovalerilcarnitina	3-metil-OH-Butiril
388	Glutarilcarnitina	3-OH-Decanoil
402	3-Metilglutaril	Adipoil

**Tabla 4. Interferencias Isobáricas en la determinación de AC**

## ***2. Desarrollo del procedimiento experimental para la determinación de acilcarnitinas en sangre impregnada en papel***

Las acilcarnitinas pueden ser extraídas de forma cuantitativa de los papeles impregnados en sangre con disolventes polares como el metanol.

La inclusión en el disolvente de extracción de patrones de estos compuestos, marcados isotópicamente, permitirá la medida de la concentración a la que se encuentran.

Los compuestos así extraídos son sometidos a una reacción de derivatización, mediante reacción con butanol en medio ácido, para su conversión en los correspondientes ésteres butílicos.

Estos compuestos pueden ser introducidos, separados y fragmentados de forma específica por Espectrometría de Masas en Tándem acoplada a Cromatografía Líquida (LCMSMS) y calculada su concentración mediante dilución isotópica.

Se desarrolla a continuación la aplicación del método, descrito en general en el apartado anterior, a la determinación de AC al análisis de sangre impregnada en papel.

### **2.1. Reactivos, patrones e instrumentación**

#### **2.1.1. Reactivos**

La extracción se realizó en metanol p.a. (LiChrosolv, Merck ref 06007)

La fase móvil empleada estuvo compuesta por acetonitrilo (LiCrosolv Merck, ref. 00030), agua (1:1) y ácido fórmico 0.005% (Merck, ref. 02264).

Para la butilación de acilcarnitinas y aminoácidos se empleó Butanol clorhídrico 3N (Regis, ref. 201007 y Riedel- de Haen, ref. 35072).

Para la preparación de reactivos se empleó agua purificada con un sistema Milli-Q (Millipore).

Se emplearon placas de microtitulación de 96 pocillos (Greiner bio-one ref. 655101 y 780270).

## ***Parte experimental***

### **2.1.2. Patrones Internos**

Se emplearon papeles impregnados de sangre con concentraciones de C2, C3, C4, C5, C6, C8, C5DC, C10, C14 y C16 conocidas, suministrados por el Center for Disease Control (CDC).

Para el calibrado se utilizó la mezcla de acilcarnitinas patrón, marcadas isotópicamente, de Cambridge Isotopes Laboratories, ref NSK-B, cuya composición se detalla en la Tabla 5. Se trata de viales liofilizados cuyos componentes deben ser reconstituídos y conservados en nevera para evitar su degradación. La mezcla se mantiene estable durante un mes y puede comprobarse su idoneidad chequeando la posible aparición de picos secundarios, de masas diferentes por modificaciones en su estructura, en los espectros diarios de trabajo. Durante el período de realización de la parte experimental del presente trabajo no fue observada dicha degradación en ningún caso.

<b>Acilcarnitinas estándar de referencia</b>	<b>Concentraciones (μM) reconstituído</b>	<b>Concentraciones (μM) disolución trabajo</b>
2H9-Carnitina (C0)	150.0	0.76
2H3-Acetilcarnitina (C2)	38.0	0.19
2H3-Propionilcarnitina (C3)	7.6	0.04
2H3-Butirilcarnitina (C4)	7.6	0.04
2H9-Isovalerilcarnitina (C5)	7.6	0.04
2H3-Octanoilcarnitina (C8)	7.6	0.04
2H9-Miristoilcarnitina (C14)	7.6	0.04
2H3Palmitoilcarnitina (C16)	15.2	0.08

**Tabla 5. Concentraciones de los patrones de acilcarnitinas presentes en la disolución trabajo.**

### **2.1.3. Instrumentación**

Tal como se ha descrito al comienzo de la parte experimental, se utilizó un equipo de triple cuadrupolo ESI-MS/MS API 2000 (Sciex) acoplado a un equipo de HPLC modelo Series 200 (Perkin-Elmer).

Para el corte de las muestras de sangre impregnada en papel y su introducción en las placas de microtitulación se empleó una taladradora automática BSD 700 (BSD tech. Brisbane, Australia) y taladradoras manuales.

Para la extracción de la sangre del papel de filtro se empleó un vórtex de sobremesa para microplacas (SBS).

## ***Parte experimental***

La evaporación a sequedad de las muestras se realizó en un evaporador Micro-DS96 (Porvair Sciences) utilizando una corriente de nitrógeno.

### **2.2. Desarrollo del método: etapa preanalítica**

#### **2.2.1. Características de la muestra**

Se utilizan discos de sangre en papel S&S 903, obtenida de acuerdo con la hoja de instrucciones suministrada por el laboratorio a los centros de recogida y clasificada como válida según los criterios establecidos en el propio laboratorio, de 1/8 de pulgada de diámetro, cortados y ordenados, que son depositados sobre las placas de microtitulación de 96 pocillos.

Se cortan asimismo discos de sangre del mismo diámetro, 1/8 de pulgada, conteniendo los patrones suministrados por el CDC y que son depositados en la primera fila de la primera placa de la tanda de trabajo y al final de ella.

#### **2.2.2. Operaciones previas con las muestras**

Las muestras son taladradas con un equipo Multipuncher BSD 700, o con taladradoras manuales, de acuerdo con los protocolos establecidos. Se preparan así tandas de trabajo que constan de muestras de sangre distribuidas sobre microplacas y que van acompañadas por la correspondiente plantilla de trabajo, en la que se recogen las referencias de las muestras correspondientes a cada posición. Las plantillas de trabajo recogen asimismo el tipo de papel y la valoración de la muestra así como las incidencias producidas durante esta operación.

Las muestras provenientes de laboratorios externos, las correspondientes a las muestras que se deseen someter a reanálisis, así como cualquier otra que no sea necesario incluir en el resto de procedimientos que se desarrollan en el laboratorio, serán taladradas e incorporadas al final de la tanda de trabajo, inmediatamente antes de los controles de cierre de tanda.

Se elabora una “lista de trabajo de acilcarnitinas”. En dicha lista se recogen todos los datos que aparecen en la plantilla de trabajo así como los correspondientes a todas las muestras taladradas manualmente.

## ***Parte experimental***

Asimismo se recogerá en ellas la información de los volúmenes de patrón preparado y sobrante, las incidencias concretas producidas durante la realización del procedimiento, las observaciones relativas a cualquier variación producida en el procedimiento habitual y las relativas al desarrollo del proceso de medida de las muestras.

### **2.2.3. Preparación de patrones**

Los viales de patrones de acilcarnitinas deuteradas suministrados por Cambridge Isotopes serán reconstituidos con 1 mL de metanol, homogeneizados y conservados entre 2 y 8° C. Se registra la fecha de preparación así como la de comienzo de uso tanto en la correspondiente Libreta de Laboratorio como en la lista de trabajo de AC correspondiente a esa fecha.

Se recomienda realizar dicha preparación al menos una hora antes de su uso del vial de AC para asegurar su completa reconstitución

Diariamente se prepara una disolución de trabajo mediante una dilución 1/200 de la disolución de patrones con metanol, para ser añadida a las muestras, de acuerdo con el procedimiento optimizado:

1. Anotar el número de muestras de la tanda correspondiente.
2. Pipetear en el recipiente correspondiente un volumen de metanol igual al número total reflejado en el paso 1, multiplicado por cien. Dicha disolución se corresponde con la preparación de patrón para añadir 100 µL a cada muestra de sangre. Este volumen será corregido en el correspondiente factor, en el caso de que se desee utilizar un volumen mayor de elución (Por ejemplo x1.2 para usar 120 µL)
3. Dividir el número total de muestras entre dos. El número resultante se corresponde con el volumen (en µL) que es preciso pipetear del vial de patrones.  
Se usarán puntas de pipeta previamente mojadas dos veces con la disolución a pipetear y se enjuagará pipeteando metanol del recipiente.
4. Tapar inmediatamente el recipiente que contiene la disolución de trabajo, homogeneizar agitando suavemente unos segundos y mantenerlo tapado hasta el momento de su uso.

5. Anotar los volúmenes empleados, incluido el volumen sobrante, en la lista de trabajo y descartar el volumen sobrante.

#### **2.2.4. Estudio del impacto de las características higroscópicas del metanol en la preparación de patrones**

Al haberse seleccionado el metanol como disolvente de extracción de las AC de las muestras de sangre impregnada en papel, y por tanto también de preparación de los patrones internos, se consideró la posibilidad de que el efecto de que sea un disolvente poco higroscópico afectase a la precisión y exactitud de los pipeteos necesarios y que por ser operaciones rutinarias realizadas cada vez que se prepara una tanda conllevasen una importante fuente de error.

Se diseñó un experimento en que se realizaron diez medidas con cuatro volúmenes diferentes que abarcasen por un lado la mayor parte del rango de la pipeta automática utilizada habitualmente, modelo P200 de Gilson con rango de trabajo de 20 a 200  $\mu\text{L}$ , y por otro los volúmenes de IS necesarios para la mayoría de las experiencias, pues el volumen de IS preparado varía en función del número de muestras a medir.

Se eligieron los volúmenes de 50 a 150  $\mu\text{L}$  y se midió el volumen real de metanol que se pipetea por pesada, vaciándolo directamente sobre un recipiente colocado en la balanza analítica (Precisa, modelo 205A) del laboratorio.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6. De las experiencias realizadas se concluyó la necesidad de mojar previamente con el metanol las puntas de plástico al pipetear pues, de esta manera, el error que se comete se mantiene casi constante y también la necesidad de hacer un ajuste en el cálculo que responda al volumen real de IS añadido.

Puesto que se realiza dos veces esta operación, una al tomar el IS concentrado y otra al dispensar sobre los pocillos donde se encuentran los discos de sangre, el error cometido será un error sistemático por exceso y multiplicado por dos.

El factor resultante a introducir resultó ser 108.35 y dos veces por realizarse dos operaciones de pipeteo que conllevan el mismo error. Dicho valor, 1.17, se introdujo como valor real del volumen de IS que se maneja a efecto del cálculo de concentraciones en la dilución isotópica que conlleva.

## Parte experimental

	%	50µL	70µL	100µL	150µL	Media	Rango
<b>Sin mojar (diferente punta)</b>	<b>Rec.</b>	80.9	76.7	84.3	88.6	82.63	76.7 - 88.6
	<b>CV</b>	2.0	2.2	1.9	1.9	2.0	1.9 - 2.2
<b>Mojando (misma punta)</b>	<b>Rec.</b>	106.8	108.9	109.0	108.7	108.35	106.8 - 109.0
	<b>CV</b>	2.3	1.6	2.0	1.8	1.9	1.6 - 2.3

**Tabla 6 : Efecto del uso de metanol sobre precisión y exactitud en preparación de los IS para la determinación de AC**

No se han observado problemas derivados de las características higroscópicas del metanol cuando se utilizan pipetas de vidrio. En las pruebas realizadas con una pipeta de doble aforo de 10 mL se obtuvo una recuperación media del 99.6% si no se mojaba la pipeta y del 99.1% si se mojaba previamente.

En las pruebas preliminares realizadas con los diferentes modelos de puntas de plástico disponibles en el laboratorio, se observaron diferencias importantes en función del plástico y diseño por lo que se optó por utilizar siempre el mismo modelo (Eppendorf Biopur, 200µL, ref 0030075021) por resultar el que mejor se adaptó a la micropipeta con que se realizó el estudio. Una vez comprobados los resultados se hizo acopio de una cantidad elevada de dicho modelo con el fin de mantener siempre una reserva que evite el error derivado del posible cambio de punta de pipeta.

### 2.3. Listados de tandas de trabajo en MS/MS

Es necesario introducir la información relativa a las muestras a medir, a partir de las correspondientes listas de trabajo, en el software Analyst de manejo del equipo de espectrometría de masas en Tándem.

El procedimiento a seguir, una vez abierto el software Analyst, es seleccionar el proyecto “newborn screening” en la ventana correspondiente, seleccionar “Batch” y elegir la denominada “Tanda Genérica”. Se introducen de forma secuencial los números correlativos de la muestras. El número de líneas de muestra se corresponde con el número total de muestras incluidas en la lista de trabajo. Se renombra el archivo de destino de la



## ***Parte experimental***

información de las muestras, presente en la columna “data file” con el mismo número o nombre asignado a cada muestra respetando la dirección de la carpeta de destino.

Es importante comprobar que el método de medida y el “script” de llamada del software de integración son los adecuados.

### **2.4. Protocolo de preparación de las placas**

Las placas se preparan de acuerdo con el protocolo siguiente:

1. Se cortan los discos de muestras y patrones y se colocan en las microplacas
2. Añadir 120 µL metanol, conteniendo patrones, a cada pocillo con muestra
3. Tapar las placas con film adhesivo, inmediatamente después de acabar cada una.
4. Extraer las AC de la sangre mediante agitación en vortex durante 25 minutos
5. Trasvasar todo el metanol posible a otra placa con el fin de separar los discos de sangre
6. Evaporar el metanol en corriente de nitrógeno dentro de vitrina extractora de gases.

NOTA: Asegurarse de que las placas están completamente secas antes de continuar

7. Añadir 60 µL de butanol clorhídrico 3N, en vitrina extractora de gases
8. Tapar las placas de nuevo con film adhesivo
9. Introducir las placas en estufa a  $65 \pm 5$  °C durante 20 minutos
10. Enfriar las placas 5 minutos en congelador
11. Evaporar a sequedad el butanol sobrante en corriente de nitrógeno, dentro de vitrina de gases
12. Esperar a que las placas evaporadas estén a temperatura ambiente.
13. Redisolver las placas con 100 µL de la fase móvil del cromatógrafo (acetonitrilo:agua, 1:1) (Micropipeta multicanal 50-300 µl)
14. Tapar con papel de aluminio, ajustar bien para evitar evaporaciones y agitar durante 5 minutos en “vortex”.
15. Colocar con cuidado las microplacas en la bandeja del muestreador automático evitando salpicaduras entre pocillos.

## **2.5. Desarrollo del método: Condiciones del experimento MSMS**

Para la medida de las AC se utilizó el modo de detección de ión precursor de  $m/z$  85 tal como se ha descrito en el apartado anterior. Esta técnica permite detectar, dentro de un rango de masa establecido, todos los compuestos que presentan un fragmento común, sin necesidad de precisarlos individualmente en el método.

Se mantiene el barrido en el primer cuadrupolo entre 200 y 550 Da. Con la detección mediante barrido del ion precursor de todos los compuestos que presentan el fragmento común.

Se utilizan, asimismo, los parámetros instrumentales optimizados para el grupo de las acilcarnitinas (DP, CE, CXP, etc).

Se utiliza una fase móvil compuesta de acetonitrilo - agua (1:1) con un 0,05% de ácido fórmico para favorecer la formación de iones cargados positivamente.

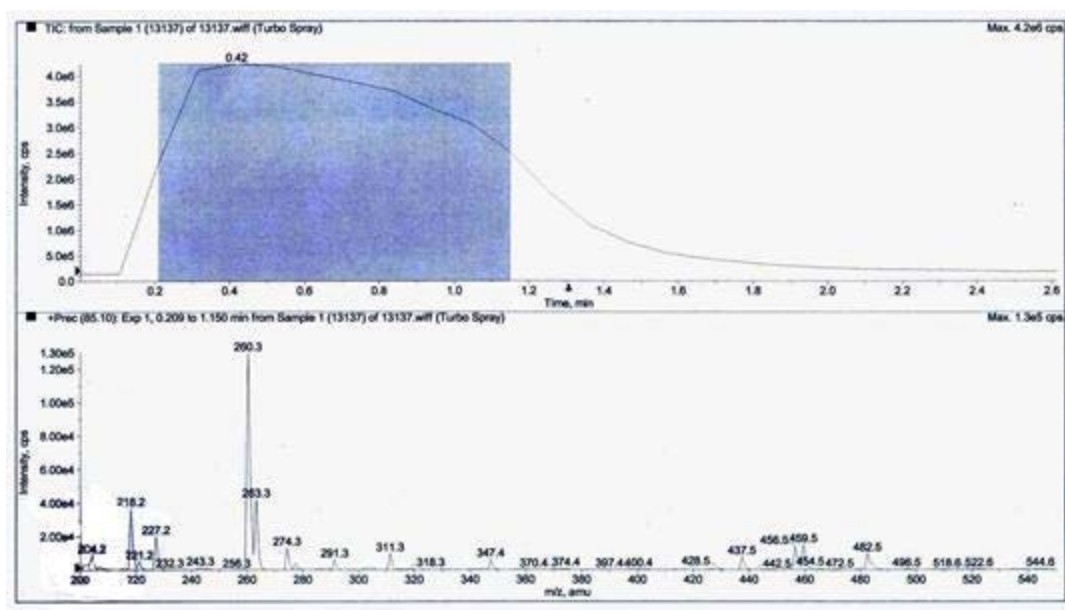
La fuente de Turboión del espectrómetro de masas se calienta a 200°C. y en ella se inyectan 30 y 40  $\mu\text{L}$  de las muestras preparadas y que son infundidas en el espectrómetro de masas con un flujo de 50 - 60  $\mu\text{L}/\text{min}$  en ionización positiva. El tiempo total de análisis por muestra es 2.6 minutos.

Se trabaja en modo “inyección en flujo” con el HPLC (formalmente no existe cromatografía pues no se emplea columna alguna).

Se ajustaron los parámetros del muestreador automático del modo siguiente:

- Ciclos lavado post-inyección 1 (250  $\mu\text{L}$ )
- Jeringa muestra: 100  $\mu\text{L}$
- Aire pre-muestra: 2  $\mu\text{L}$
- Exceso de volumen: 2  $\mu\text{L}$
- Nivel aguja 10 %
- Replicados: 1
- Volumen del Loop: 100  $\mu\text{L}$

Se obtienen perfiles de inyección que responden al total de iones detectados (TIC) como el que aparece en la Figura 13.



**Figura 13. Perfil de inyección de una muestra (TIC) y espectro típico de AC en el ensayo de precursores utilizado.**

## **2.6. Desarrollo del método: Cuantificación de las muestras por dilución isotópica**

La cuantificación de los compuestos se basa en el empleo de estándares internos marcados isotópicamente (IS) que son añadidos en cada posición de las placas. De este modo se pueden corregir las variaciones de la intensidad de la señal debidas a la composición de la fase móvil, o de la compleja matriz en que las moléculas son analizadas.

Así, los resultados se cuantificaron comparando la señal del metabolito con la de un patrón interno idéntico marcado o, en ausencia del mismo, con uno de parecida estructura y fragmentación o de masa molecular más próxima y similares propiedades químicas. Se midieron las abundancias relativas de señal del analito y del patrón interno correspondiente. Asumiendo un equilibrio completo entre la muestra y el estándar interno, y conociendo la cantidad de muestra de partida, se determina la concentración endógena de los compuestos.

Este método de cuantificación está basado en la ecuación siguiente:

## *Parte experimental*

$$C(\mu\text{mol} / L) = \frac{I_{\text{analito}} \times [IS(\mu\text{mol})]}{I_{IS} \times V_{\text{muestra}} (L)}$$

donde C es la concentración endógena del compuesto.

I es la intensidad del pico correspondiente para la transición del compuesto.

Los patrones internos marcados isotópicamente (IS) usados para este ensayo se recogen en la Tabla 5. Para cada AC incluida en el perfil de trabajo, se seleccionó aquel IS que por masa molecular y estructura pueda preverse que tiene un comportamiento similar.

En la Tabla 7 se muestra cada AC medida y el IS usado para su cuantificación. En todos los casos se asumió un factor de respuesta de 1. Todas las AC con masa superior a 459.6, correspondiente a D3C16, fueron medidas frente a este compuesto.

*Parte experimental*

<i>Nombre</i>	<i>Simbolo</i>	<i>MASA</i>	<i>IS</i>	<i>Ref. MASA</i>
CARNITINA LIBRE	C0	218.3	227.3	227.3
ACETIL	C2	260.4	263.4	263.4
ACRILIL	C3:1	272.4		277.4
PROPIONIL	C3	274.4	277.4	277.4
BUTIRIL	C4	288.4	291.4	291.4
TIGLIL	C5:1	300.4		311.4
ISOVALERIL	C5	302.4	311.4	311.4
3-OH-BUTIRIL	C4OH	304.4		311.4
BENZOIL	Benz	310.4		311.4
HEXANOIL	C6	316.5		347.4
3-OH-ISOVALERIL	C5OH	318.4		347.4
2-MET-3-OH-BUTIRIL	HMG	318.4		311.4
3-OH-HEXANOIL	C6-OH	332.4		347.5
OCTENOIL	C8:1	342.5		347.5
OCTANOIL	C8	344.5	347.5	347.5
MALONIL	C3DC	360.5		347.5
DECADIENOIL	C10:2	368.5		347.5
DECENOIL	C10:1	370.5		347.5
DECANOIL	C10	372.5		347.5
METILMALONIL	MMA (C4DC)	374.5		291.5
GLUTARIL	Glut (C5DC)	388.5		347.5
DODECADIENOIL	C12:2	396	437.6	437.6
DODECENOIL	C12:1	398.6		437.6
DODECANOIL	C12	400.6		437.6
3-METILGLUTARIL	MeGlut	402.6		347.6
MIRISTODIENOIL	C14:2	424.6		437.6
MIRISTOLEIL	C14:1	426.6		437,6
MIRISTOIL	C14	428.6	437.6	437,6
3-OH-MIRISTOLEIL	C14:1OH	442.6		437,6
3-OH-MIRISTOIL	C14OH	444.6		437,6
PALMITOLEIL	C16:1	454.6		459,6
PALMITOIL	C16	456.6	459.6	459,6
3-OH-PALMITOLEIL	C16:1OH	470.6		459,6
3-OH-PALMITOIL	C16OH	472.6		459,6

**Tabla 7. Relación de AC medidas y IS seleccionados para su cuantificación.**

## **2.7. Tratamiento de datos**

Los datos de las muestras fueron tratados mediante el software Chemoview 1.2 (Applied Biosystems/MSD SCIEX). El software calcula la intensidad de cada uno de los metabolitos y la divide por la señal del patrón interno marcado idéntico, o en su ausencia aquel con estructura o masa molecular más próxima y propiedades químicas similares.

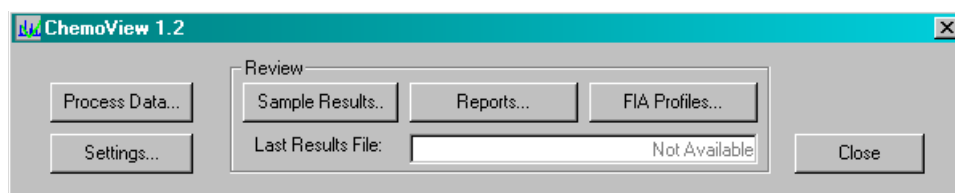
Consiste en una base de datos en Access® que dispone de una estructura genérica en la cual se va introduciendo toda la información relativa a las AC, los IS, las concentraciones, los datos del experimento, los puntos de corte con los que compararlos, etc.

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, los valores de concentración fueron calculados de forma directa por el software de procesado, considerando que su respuesta es idéntica a la de su patrón interno correspondiente.

Los resultados obtenidos son, finalmente, exportados a una hoja Excel® para cálculos posteriores.

El cálculo de los índices estadísticos descriptivos de la base de datos poblacional se efectuó mediante el paquete estadístico SPSS, versión 13.

El acceso al software de integración de los espectros y de cálculo “Chemoview” se realiza a través de la pantalla recogida en la Figura 14 .



**Figura 14. Pantalla de acceso al programa Chemoview**

Para adaptar la base de datos al uso concreto de cuantificación de AC en sangre se debe a continuación generar la información necesaria relativa al experimento, tanto en lo que se refiere a preferencias de procesado como de generación de informes, Figura 15. Se incluye aquí el volumen de muestra, el volumen de IS empleado, la tolerancia en la asignación de masas, el modo de integración y la referencia a la base de datos donde se encuentra localizada toda la información de las AC.

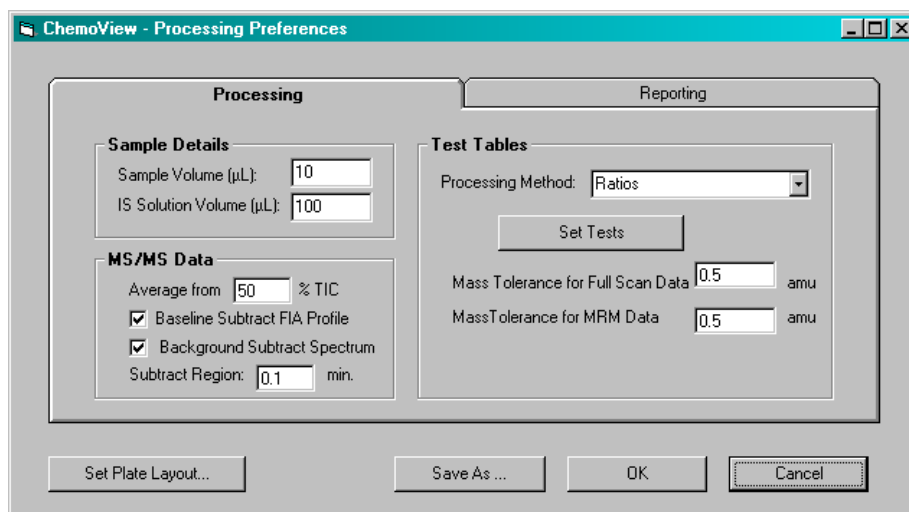


Figura 15. Establecimiento de las características de procesado.

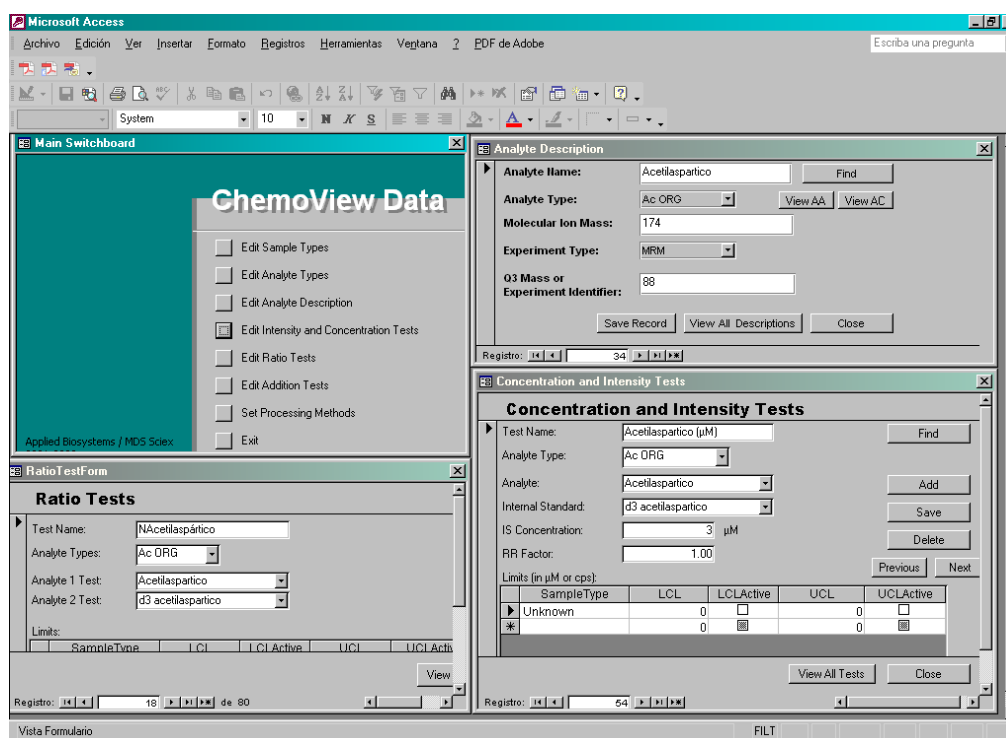


Figura 16. Definición de los parámetros relacionados con las AC, los IS, los ratios de AC, los puntos de corte, etc.

## ***Parte experimental***

En la Figura 16 aparecen agrupadas cuatro pantallas diferentes. Arriba, a la izquierda, el menú general de la base de datos donde se definen los compuestos, sus características, etc. A su derecha la pantalla donde se recoge la descripción de analitos, tipo de experimento, etc. Abajo, a la izquierda, la ventana correspondiente a la definición de ratios y método de procesado y a su derecha otra donde se introduce la concentración e IS a utilizar.

El cálculo y la generación de la correspondiente hoja Excel con las concentraciones de todas las AC se realizará de forma automática sincronizando el funcionamiento del software Chemoview con el del Analyst durante el proceso de medida de las tandas de trabajo. Con esta forma secuencial de combinar ambos programas, se consigue tener los resultados finales a los pocos minutos de finalizar la lectura de las placas de muestras.

Dicha hoja de cálculo con los resultados no se considerará como aceptada hasta que se haya realizado la supervisión de los perfiles de muestra mediante Chemoview y se validen las concentraciones de todos los parámetros en las muestras patrón del CDC y EWS mediante el software NeoScreen, tal como se describe en el apartado siguiente.

### **2.8. Validación de tandas de resultados con NeoScreen**

Para la aceptación de los resultados de las tandas de trabajo será necesario realizar previamente su validación a través de las muestras control presentes en ellas, de acuerdo con los criterios relativos a puntos de corte y rangos de referencia, control de calidad interno y externo y marcadores específicos de cada patología que aparecen recogidos en los apartados inmediatos a este.

Este proceso se realiza con el apoyo del software NeoScreen desarrollado en colaboración por la Universidad de Coimbra<sup>65</sup>.

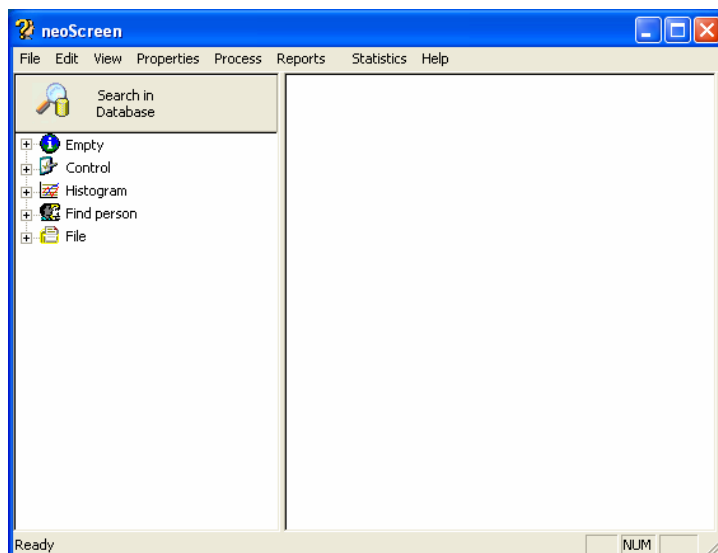
Se trata de un programa desarrollado de forma específica para el manejo de los ficheros Excel generados en Chemoview y que permite consultar y validar la información analizada además de tener acceso a una serie de funciones resultantes de la posibilidad de manejar el archivo histórico de análisis.

Estas funciones en nuestro caso están matizadas por manejar una versión no completa y ha sido utilizado solamente con el fin de validar las tandas de trabajo y de archivo.



## *Parte experimental*

Una vez instalada la aplicación es necesario definir un conjunto de propiedades antes de poder analizar la información: Parámetros, espectrómetros de masas, controles, enfermedades a diagnosticar, reglas de interpretación de los marcadores, etc.



**Figura 17. Pantalla general de acceso a NeoScreen**

El acceso se realiza a través del menú general reflejado en la Figura 17 y será preciso suministrarle a la base los parámetros a estudiar (Figura 18).

En sucesivas etapas será necesario, definir el equipo de espectrometría de masas concreto que suministra la información, introducir los nombres de los controles de calidad a utilizar y los parámetros que incluirán (Figura 19).

Análogamente, es necesario ir introduciendo la información de las enfermedades a detectar, de las reglas a utilizar en el cálculo de percentiles, etc.

En las Figura 20 y Figura 21 se presenta la relación de patologías metabólicas a detectar, que se han introducido en la base de datos y las reglas para el cálculo de percentiles.

En la Figura 22 aparece la información suministrada por NeoScreen cuando se accede por el menú de consultas de resultados.

En el momento de la introducción de una hoja Excel de Chemoview, mediante la pantalla de la Figura 23 se confirma cómo y qué información va a ser aceptada, de acuerdo con las reglas preestablecidas, y una vez realizada dicha introducción y realizados los cálculos pertinentes, se muestra una pantalla, a la que corresponde la Figura 24, donde aparece un

## Parte experimental

resumen histórico que permite la vigilancia permanente de la información que se introduce en la base de datos de NeoScreen.

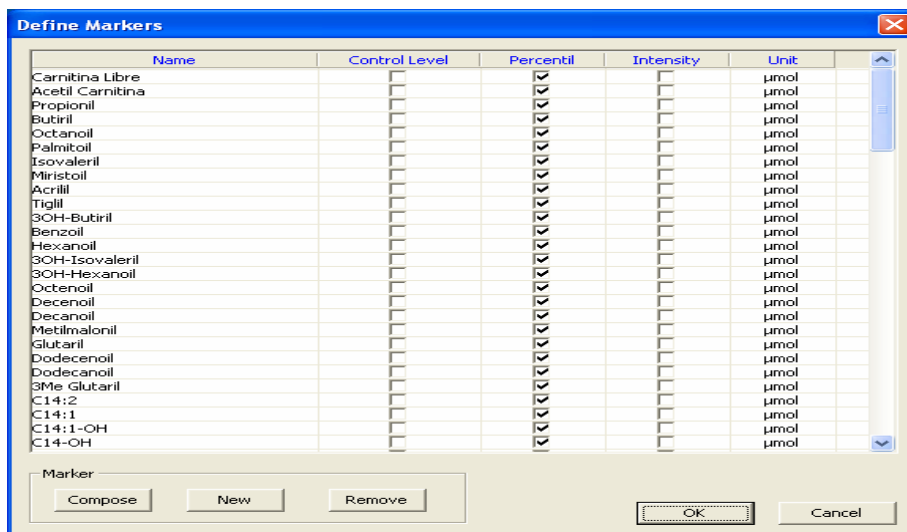


Figura 18. Definición de los parámetros a estudiar

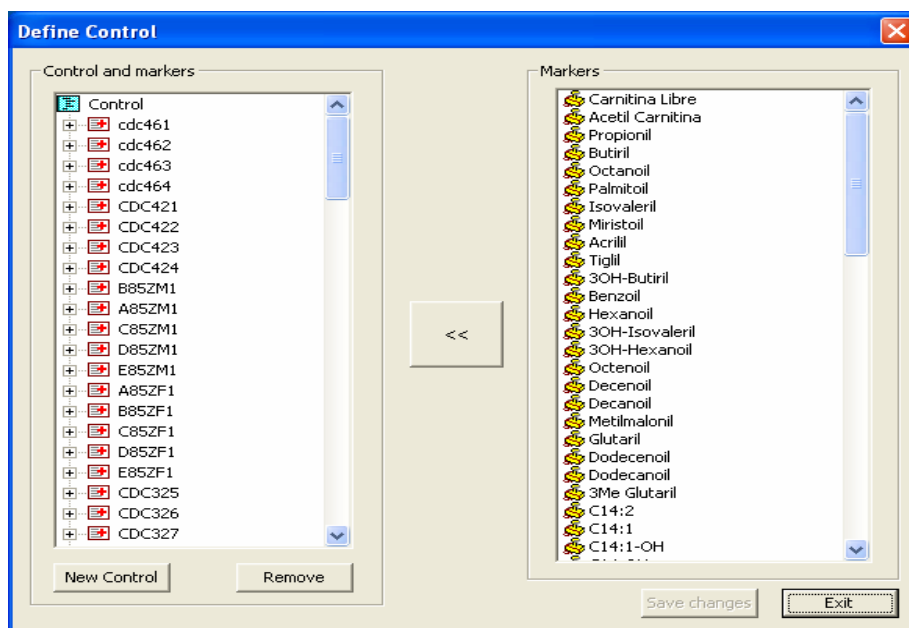


Figura 19. Los controles a utilizar y parámetros incluidos en ellos

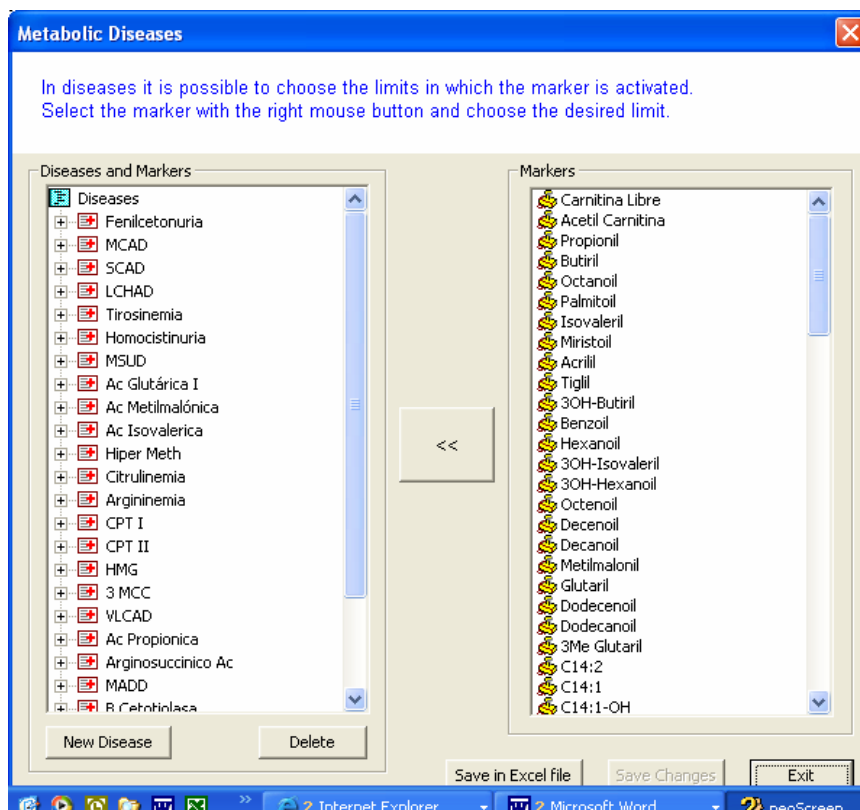


Figura 20. Enfermedades a estudiar y metabolitos diagnósticos de cada una

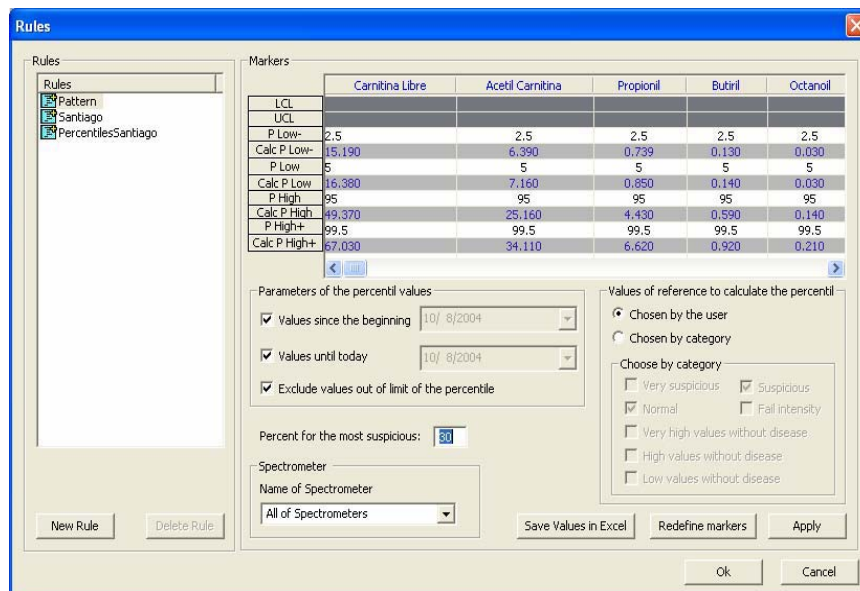


Figura 21. Definir las reglas de cálculo y los análisis a incluir en ellos

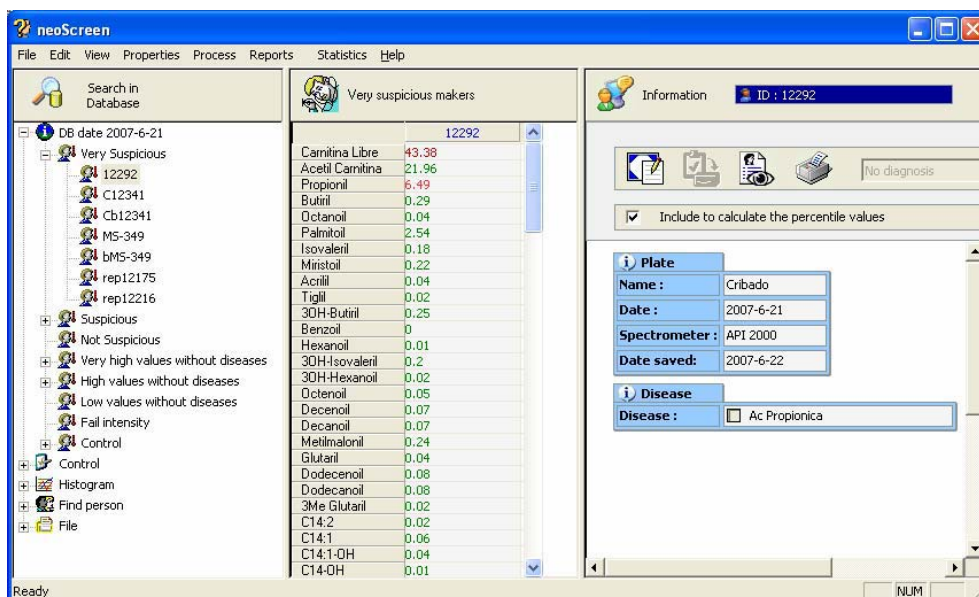


Figura 22. Ejemplo de la información mostrada desde la base de datos

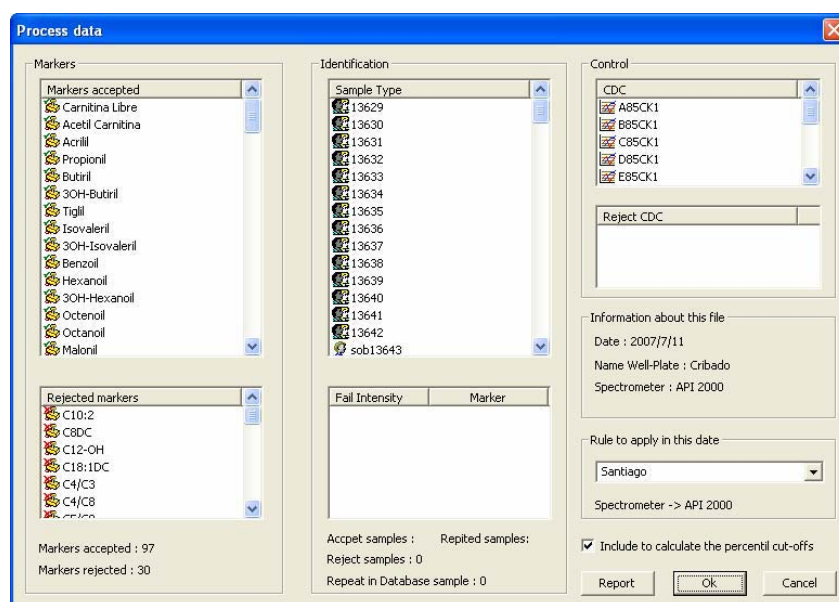
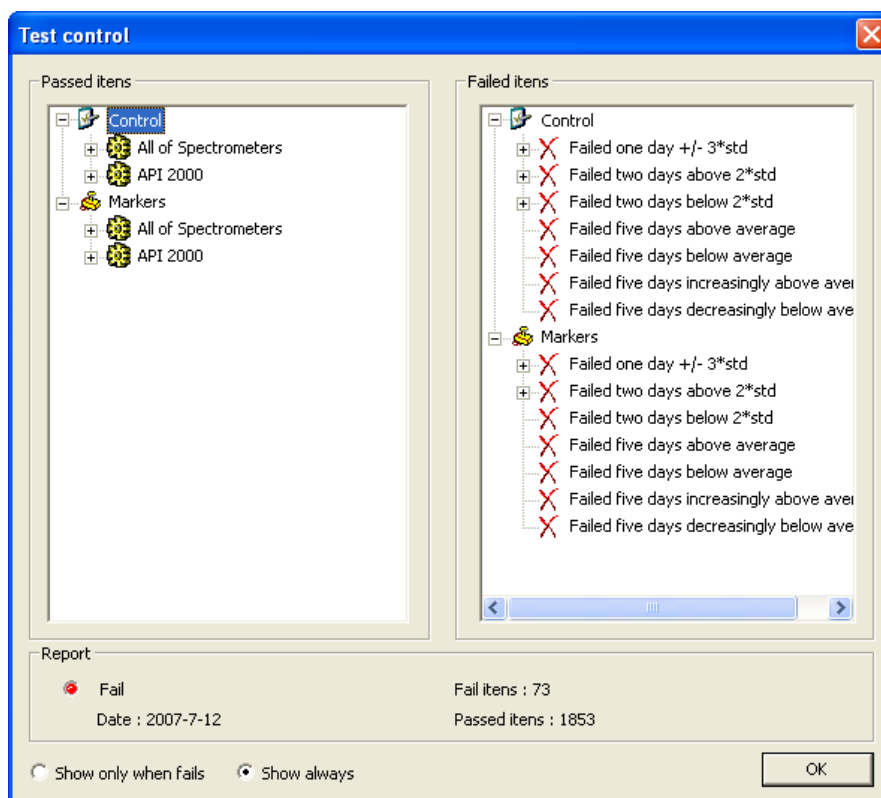


Figura 23. Menú de introducción de la información de las Excel de Chemoview

## Parte experimental

Existen asimismo otras funcionalidades, no mostradas aquí, que permiten conocer el número de muestras por día, mes y año, las medias de los parámetros, los diagnósticos realizados, etc.



**Figura 24. Tests permanentes de todas las concentraciones de los parámetros introducidos.**

Esta última ventana, recogida en la Figura 24, dispone de otras funciones relativas a las medias de los parámetros y el número de desviaciones respecto a ellas que pueden ser consultadas manualmente y que serían de gran utilidad en el caso de manejar series de resultados diarios más largas.

De cada experimento introducido a través de la correspondiente hoja Excel, NeoScreen toma los valores nuevos de cada parámetro y los va añadiendo a los registros de seguimiento que ha ido generando.

## Parte experimental

De este modo es posible controlar de modo sencillo, y en base a ello darlo por bueno, que no se han producido errores en la preparación o en la manipulación, que el instrumento esté midiendo bien y no se producen derivas, etc.

En la Figura 25 y la Figura 26 aparecen los registros, correspondientes a aproximadamente tres meses de trabajo, de los valores obtenidos para C3 y C8. Se representan los intervalos correspondientes a dos y a tres desviaciones estándar del conjunto de valores resultantes de introducir las diferentes experiencias.

Sobre dichas gráficas, se puede controlar las posibles desviaciones que se producen con el fin de validar resultados, eliminar los posibles valores aberrantes derivados de errores experimentales, conocer los CV globales que se están obteniendo en cada momento, etc.

La base de datos generada se actualiza automáticamente, de forma diaria, de manera que va introduciendo en el cálculo global los nuevos resultados.

En cada momento es posible rechazar un grupo de resultados, considerados no válidos, para que no sea tenido en cuenta a efectos globales y distorsione los rangos.

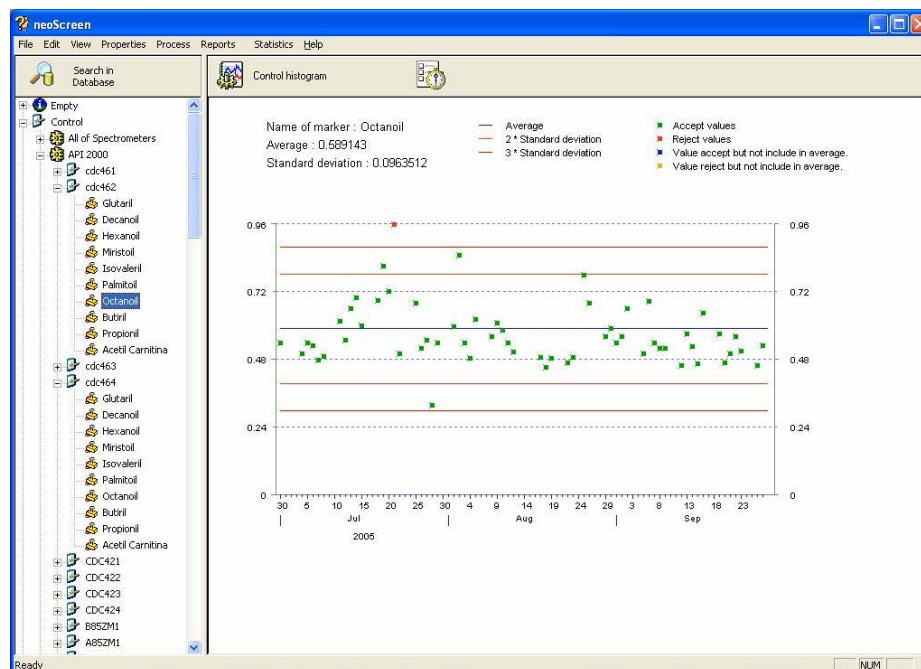
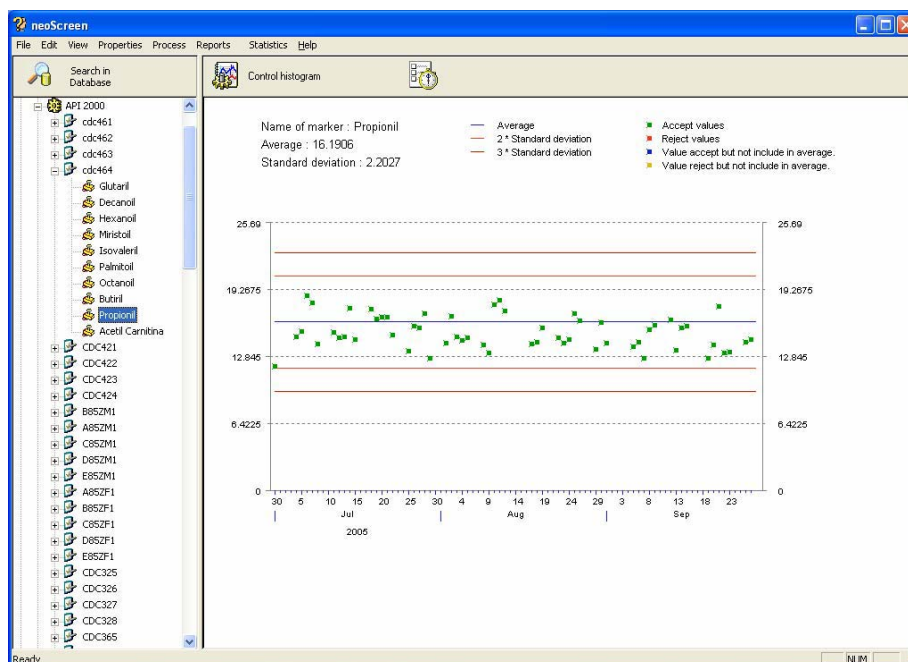


Figura 25. Registro diario de los valores de la Octanoilcarnitina en una muestra control en NeoScreen



**Figura 26. Registro diario de los valores de la Octanoilcarnitina en una muestra control en NeoScreen**

## 2.9. Cálculo de rangos de referencia, percentiles y puntos de corte

Se considerarán como rangos de referencia válidos para el presente fin aquellos que se obtengan a partir de la población neonatal objeto del estudio.

Se calcularán los diferentes percentiles sobre un grupo representativo de recién nacidos objeto del programa de cribado neonatal. Para ser considerados válidos deben ser obtenidos con un grupo que conste de al menos 2000 niños.

Se definen tres puntos de decisión o de corte.

1. Reanálisis: Aquel que define el límite superior o inferior establecidos para un parámetro y para la población objeto de estudio. Se corresponde con los percentiles 1 y 99 y si es rebasado implica la repetición de la prueba.
2. Alerta: Aquel que define las limitaciones a admitir en los valores de un parámetro como consecuencia de interferencias fisiológicas o medicamentosas, inadecuada toma de muestra, presencia de enfermedades diferentes a las objeto de diagnóstico, alimentación, etc. Para este fin se establecen de forma general como límites los percentiles 0.5 y 99.5. En caso de ser rebasados, se repetirá el análisis y, de confirmarse, se procederá a la solicitud de nueva muestra.

## *Parte experimental*

3. Alarma: Aquel que supone la superación de los límites justificables de toda manera salvo por la presencia de una de las patologías objeto del diagnóstico precoz. Se establece como límite para este fin el p99.9.

Los puntos de corte así obtenidos son revisados cada vez que se produzca una modificación en el procedimiento que pueda afectarlos y en todo caso serán contrastados, y en su caso modificados, anualmente con resultados obtenidos a partir de los análisis realizados a un grupo de recién nacidos independiente del usado en la anterior revisión.

### **2.10. Control de calidad del método**

Ha sido necesario desarrollar procedimientos de control de calidad (CC) similares a los de cualquier método analítico en el laboratorio y adaptar la sistemática a la forma de trabajo por tandas que es habitual en las aplicaciones de la MS/MS a series medias o grandes de pacientes y con la premisa añadida de un planteamiento de cribado metabólico, no de cuantificación de la concentración de las AC aunque en muchos casos la información obtenida sea “casi” cuantitativa.

La organización del CC del procedimiento desarrollado para la determinación de AC en sangre ha pasado por tres etapas:

La primera de ellas, tras la puesta a punto del método, estuvo apoyada en muestras preparadas en el propio laboratorio. Se corresponde con un período de poco más de seis meses y tiene poco interés. Se trata de un CC exclusivamente interno, limitado y que abarca el periodo de trabajo realizado en 2000 y comienzo del 2001

La segunda de ellas, estuvo apoyada en programas piloto externos de CC del CDC y supuso el espaldarazo para las determinaciones que se llevaban realizando desde un tiempo atrás. Esta etapa abarca al 2001 y parte del 2002.

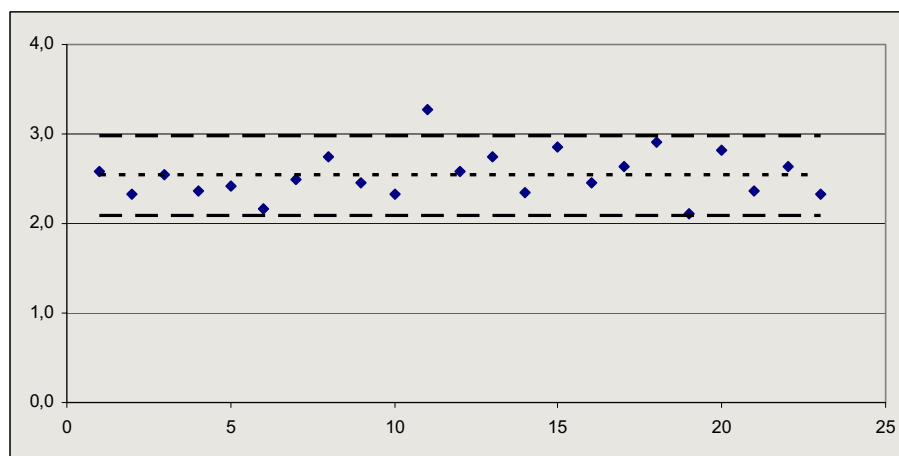
La tercera y más larga, desde mediados de 2002, ya es una etapa en que dispusimos de materiales y herramientas de control potentes y que permiten manejar con absoluta garantía la abundante información acumulada.

En cuanto a requerimientos de CC en cada tanda de trabajo, cuando se manejan muestras de pacientes con fines diagnósticos, se hace imprescindible el manejo de blancos adecuados de muestra y muestras de al menos dos niveles de concentración para el CC interno.



### *Parte experimental*

En la primera etapa, a partir de un pool de sangres se prepararon, añadiendo patrones de acilcarnitinas C2, C3, C5, C8 y C16 puros suministrados por H.T. Brink (H. Univ. Ámsterdam), dos muestras con concentraciones añadidas consideradas “baja” y “alta”. Se impregnaron papeles dejando absorber 80  $\mu$ L de sangre en cada mancha, se secaron y se almacenaron a 4°C. Estas dos muestras fueron analizadas en cada tanda de trabajo y con ellas se realizaron gráficas mensuales, tipo Levy-Jennings (Figura 27), y similares también a las que se recogen en las Figura 25 y Figura 26 de NeoScreen. Es necesario realizar una gráfica para la validación diaria de resultados de cada una de las carnitinas incluidas en las sangres control, incluidas en las tandas de trabajo, a partir del contraste con el intervalo aceptable obtenido sobre el valor teórico.



**Figura 27: Gráfica mensual realizada para la validación diaria de resultados, en este caso de C4, dentro de las tandas de trabajo.**

Para el aseguramiento externo de la calidad se hace uso de programas específicos de “proficiency testing” que evalúan la calidad de los procedimientos de medida de forma periódica. Dichos programas no estuvieron disponibles para el estudio de AC en sangre hasta 2002. Se trata de muestras que deben ser manejadas y analizadas rutinariamente, de la misma forma que las de los pacientes.

Se recoge, a continuación, información de los programas externos de CC en los que participa nuestro laboratorio con los resultados obtenidos mediante el método puesto a punto para la determinación de AC en sangre en papel.

## *Parte experimental*

### **2.10.1. Programa “Quality Control” del CDC para AC en sangre impregnada en papel**

Se trata de un programa semestral que suministra cuatro muestras impregnadas en papel en cantidad suficiente como para ser incluidas de modo rutinario en todos los experimentos de ese período. A demanda, además, se suministran cantidades adicionales si las necesidades de un laboratorio cambiasen. Comenzó a funcionar en 2002.

Las cuatro muestras recibidas responden a una sangre base y a tres obtenidas por adición a ella de concentraciones crecientes para cada una de las AC incluidas en el programa. El programa incluye: C3, C4, C5, C5DC, C6, C8, C10, C14 y C16. Se suministra un certificado de composición, donde aparecen por un lado las concentraciones añadidas y por otro las obtenidas experimentalmente con un intervalo de confianza del 95% que sirve de referencia para los valores esperables con lo cual cumple funciones de control de calidad interno y externo.

Se reciben papeles SS-903 donde se han realizado de forma automatizada dispensaciones de 100  $\mu$ L para tener manchas de sangre homogéneas tanto en composición como en distribución interna, aunque la recomendación es que se tomen discos del centro de la mancha y que se deseche el borde exterior.

Con el fin de evaluar la respuesta de cada laboratorio, se deben suministrar al CDC resultados duplicados de todas las muestras y correspondientes a cinco días diferentes.

Con los resultados obtenidos, se elaboran informes muy exhaustivos y que, dado el elevado número de laboratorios participantes, en 2005 en torno a 295 de más de 50 países aunque solo en torno a 90 suministran resultados para AC, permite desglosar los resultados por grupos en función de la variante técnica empleada. No se suministran gráficos individuales de cada laboratorio.

## Parte experimental

TABLE 14n. 2006 Quality Control Data  
Summaries of Statistical Analyses

### PROPIONYLCARNITINE ( $\mu\text{mol C3/L}$ whole blood)

Method	N	Mean	Average Within Lab SD	Total SD	Y- Intercept*	Slope
Lot 565 - Nonenriched 0 $\mu\text{mol/L}$ whole blood						
Derivatized - MS/MS Non-Kit	667	1.57	0.22	0.29	1.57	1.14
Non-derivatized MS/MS Non-Kit	49	1.50	0.18	0.32	1.33	1.20
Derivatized - MS/MS PE NeoGram	177	1.37	0.14	0.22	1.25	1.05
Non-derivatized MS/MS PE NeoGram	48	1.31	0.24	0.31	1.27	1.02

**Figura 28: Ejemplo de una Tabla resumen de resultados de los informes del programa de CC del CDC para AC en sangre**

### 2.10.2. Programa externo “Proficiency testing” (PT), o de aseguramiento de la calidad, del CDC

Se trata de un programa trimestral dentro del cual se suministran cinco muestras en cada ocasión que deben ser chequeadas como muestras rutinarias dentro de la sistemática de trabajo. Comenzó a funcionar, como programa piloto a comienzos de 2001 y nuestro laboratorio participa en el desde la segunda mitad de ese mismo año.

Incluye las mismas AC que el programa de CC y cada muestra debe ser evaluada para todas las AC como negativa, resultados dentro de los límites establecidos por el propio laboratorio, o presuntamente positiva si está fuera de dichos límites. Cada laboratorio suministra al CDC los puntos de corte usados para la clasificación anterior (aunque, en caso de no disponer de ellos, el propio CDC sugiere unos) con lo que los laboratorios pueden estudiar cómo son dichos puntos de corte frente a los del resto de laboratorios. Los resultados clasificados como erróneos se corresponden con posibles falsos positivos o negativos respecto al funcionamiento del programa y como tal quedan registrados.

Los datos son introducidos informáticamente y el CDC elabora de forma inmediata (habitualmente menos de una semana) informes donde da a conocer los valores globales y la presencia o no de errores para cada laboratorio. Participa también un elevado número de laboratorios, 308 en 2005, aunque al igual que en el programa de CC sólo en torno a 90 suministran resultados de AC.

Anualmente el CDC elabora informes y envía la correspondiente acreditación a los laboratorios participantes.

## Parte experimental

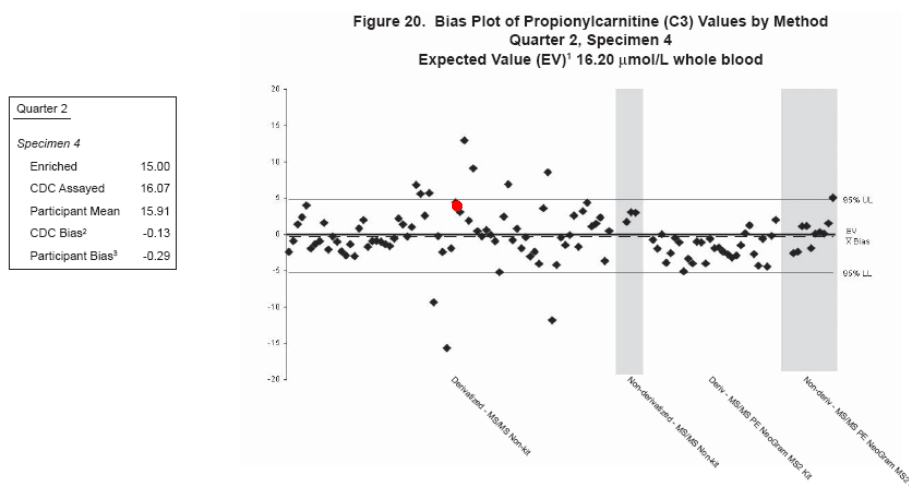


Figura 29: Gráfico tipo incluido en los informes del programa de PT del CDC.

### 2.10.3. Programa externo cualitativo de aseguramiento de la calidad de AC en sangre del ERNDIM

Se trata de un programa de PT que realiza envíos semestrales de tres muestras que provienen de pacientes reales y que deben ser procesadas de forma rutinaria. Comenzó a funcionar en 2004 y en 2005 participaron 67 laboratorios aunque sólo responden en torno a 50.

Acompañando a las muestras, se reciben unas notas acerca de los pacientes y en las respuestas se solicitan propuestas de diagnóstico y los resultados cuantitativos obtenidos que las avalan, así como una pequeña discusión del caso. Frecuentemente se trata de pacientes a tratamiento y esto debe ser tenido en cuenta a la hora de la evaluación.

Los informes se reducen a un resumen de las propuestas recibidas y una valoración de aciertos y fallos en las propuestas diagnósticas. No se suministran resultados numéricos resumen de los enviados por los laboratorios.

### 2.10.4. Programa externo de aseguramiento de la calidad (PT), del Hospital Universitario de Hamburgo (Dr. Lukacs)

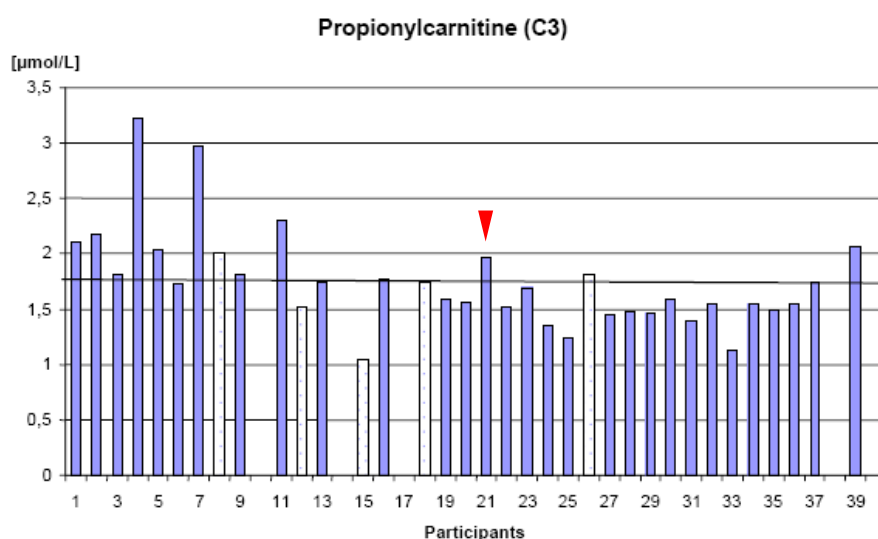
Se trata también de un programa de PT aunque la evaluación que se realiza permite sacar conclusiones de CC. Comenzó a funcionar en 2004.

## Parte experimental

Suministra semestralmente tres muestras de pacientes y suministra solamente la edad y algún otro dato general.

Se solicita de los participantes información completa en hoja Excel de los resultados cuantitativos para todas las AC así como de los puntos de corte utilizados y asimismo se debe realizar alguna propuesta diagnóstica.

Los informes permiten contrastar los resultados frente a los de todos los laboratorios en gráficos de barras donde cada uno puede situar y valorar los suyos concretos. En 2005 eran en torno a 40 los laboratorios participantes y pertenecientes a 18 países diferentes.



**Figura 30: Resultados de C3 de los laboratorios participantes en el programa externo de PT de Hamburgo.**

### 2.10.5. Control interno. Criterio de aceptabilidad

Las muestras de sangre impregnada sobre papel están afectadas por una serie de variables que hacen que los coeficientes de variación de los métodos que estudian sus componentes sean por lo general mucho más elevados que los equivalentes de muestras líquidas.

La sangre es una mezcla de células y plasma y por tanto su distribución en el papel puede no ser homogénea y se verá afectada por el hematocrito y por el volumen de muestra dispensado sobre el papel. A su vez, el volumen de muestra por unidad de superficie se verá afectado por ellos y además por la constitución del propio papel y por la precisión en el corte del disco.

## ***Parte experimental***

Para el papel SS-903, se considera que en un disco de papel de 1/8 de pulgada hay  $1.30 \pm 0.19 \mu\text{L}$  si se impregna sangre con los glóbulos rojos lisados y  $1.54 \pm 0.17 \mu\text{L}$  si es con ellos intactos.<sup>66</sup> La media de absorción para 21 lotes del papel SS 903 suministrada por Whatman es de 1.35 y 1.44  $\mu\text{L}$ , respectivamente. Esto hace que el volumen de sangre a considerar sea, para un hematocrito del 55%, de entre 3.2 y 3.4  $\mu\text{L}$ . Nosotros hemos considerado en todo nuestro trabajo 3.4  $\mu\text{L}$  como el volumen contenido en el disco de 1/8 de pulgada utilizado.

Se considerarán válidas las tandas de resultados siempre que ninguno de los metabolitos utilizado como marcadores diagnósticos incumpla (adaptación de las reglas de Westgard) el criterio que aparece recogido en el documento C50P del CLSI y que marca en el 20% arriba o debajo los límites de desviación respecto a los valores establecidos.

Al tratarse de una técnica “multiple”, puede suceder que estas desviaciones sucedan en solo uno de los controles y en este caso se da por válida. No serán válidas aquellas tandas en que un metabolito “diagnóstico” aparezca alterado a todos los niveles de concentración.

### **2.10.6. Resumen de resultados del CC del CDC en 2005**

En cada tanda de trabajo se incluyen los controles internos del CC del CDC repartidos a comienzo y final de las tandas.

De acuerdo con lo anterior es posible revisar el comportamiento del método no sólo día a día sino durante períodos largos de tiempo.

En la Tabla 8 y la Tabla 9 se resumen todos los resultados obtenidos a lo largo de 2005. Durante este tiempo, se utilizaron dos lotes diferentes de controles y con estos resultados se han obtenido datos de precisión interensayo global a lo largo del año. Estos resultados son, en general, acordes con los obtenidos durante el proceso de validación del método y serán objeto de discusión más adelante.

Aunque se consideró carente de interés, de forma similar podría estudiarse la exactitud del método pues se trata de muestras de las que se dispone de un valor de referencia.

*Parte experimental*

	CDC 461		CDC 462		CDC 463		CDC 464	
(n=183)	Media±DE	CV	Media±DE	CV	Media±DE	CV	Media±DE	CV
<b>Co</b>	57.2±8.0	14.1	52.8±7.1	13.5	68.5±9.0	13.1	74.9±10.3	13.7
<b>C2</b>	20.6±3.3	16.1	20.9±3.1	15.1	22.5±3.9	17.3	31.8±7.0	22.1
<b>C3</b>	2.20±0.37	16.7	5.14±0.86	16.8	10.6±1.67	15.8	15.9±2.58	16.2
<b>C4</b>	0.26±0.07	25.6	1.02±0.18	18.1	2.24±0.31	13.8	4.67±0.73	15.7
<b>C8</b>	0.06±0.02	34.7	0.59±0.11	18.3	1.23±0.18	15.0	2.98±0.52	17.4
<b>C16</b>	1.28±0.20	15.9	4.10±0.62	15.2	7.91±1.18	14.9	11.9±2.82	23.5
<b>C5</b>	0.16±0.03	21.5	0.54±0.08	14.5	1.51±0.19	12.8	2.92±0.39	13.5
<b>C14</b>	0.20±0.06	28.7	0.55±0.10	17.5	1.46±0.24	16.3	2.93±0.52	17.8
<b>C6</b>	0.04±0.03	69.5	0.50±0.09	18.9	1.05±0.17	15.8	2.71±0.46	16.9
<b>C10</b>	0.07±0.02	33.4	0.41±0.09	20.9	1.19±0.20	16.8	2.28±0.46	19.9
<b>C5DC</b>	0.04±0.02	45.3	0.16±0.04	23.9	0.30±0.07	22.6	0.58±0.11	18.3
<b>C18</b>	1.27±0.22	17.4	1.06±0.17	16.5	1.20±0.20	16.8	1.12±0.24	21.3

**Tabla 8. Resumen de resultados del CC del CDC durante la primera parte de 2005**

	CDC 561		CDC 562		CDC 563		CDC 564	
(n=80)	Media±DE	CV	Media±DE	CV	Media±DE	CV	Media±DE	CV
<b>Co</b>	44.9 ± 4.2	9.5	48.0±5.3	11.0	51.6±6.5	12.5	58.4±6.4	10.9
<b>C2</b>	14.6±1.4	9.9	14.1±1.6	11.5	13.7±1.5	11.0	14.3±1.7	12.2
<b>C3</b>	2.17±0.32	14.6	5.58±0.72	12.9	11.2±1.67	14.9	16.5±2.64	16.0
<b>C4</b>	0.26±0.06	23.0	1.14±0.17	15.3	2.44±0.30	12.2	4.92±0.87	17.6
<b>C8</b>	0.07±0.02	34.9	0.63±0.10	16.4	1.19±0.17	14.7	2.97±0.54	18.3
<b>C16</b>	0.85±0.12	14.1	4.19±0.56	13.3	7.79±1.20	15.5	11.9±1.93	16.3
<b>C5</b>	0.16±0.03	19.5	0.61±0.08	13.9	1.51±0.17	11.2	3.07±0.54	17.5
<b>C14</b>	0.15±0.05	31.8	0.48±0.09	18.2	1.43±0.24	17.0	3.00±0.58	19.4
<b>C6</b>	0.05±0.03	61.1	0.57±0.09	15.4	1.13±0.18	15.8	2.92±0.51	17.4
<b>C10</b>	0.09±0.03	35.9	0.46±0.07	16.1	1.20±0.21	17.6	2.40±0.49	20.3
<b>C5DC</b>	0.04±0.02	51.6	0.18±0.04	24.2	0.35±0.07	20.4	0.69±0.13	18.2
<b>C18</b>	0.85±0.15	17.6	0.85±0.13	15.0	0.84±0.13	15.3	0.87±0.18	20.5

**Tabla 9. Resumen de resultados del CC del CDC durante la segunda parte de 2005**

### **3. Estudio del método**

En el presente capítulo se presenta el estudio del método en cuanto a imprecisión, inexactitud, linealidad y límite de detección. Para abordar estos aspectos, se tomó en consideración el criterio del CLSI/NCCLS, organización que publica los documentos de consenso de mayor difusión en los laboratorios clínicos a nivel internacional. En cada apartado, se adoptó el protocolo que se ajustaba mejor a la situación analítica real del MSMS aplicado al cribado neonatal sobre muestras de sangre impregnada en papel. El estudio se realizó sobre muestras de control externo, CDC, y tomando como referencia aquellos parámetros que estaban valorados para el mismo método por dicho organismo (C2, C3, C4, C5, C6, C8, C10, C14, C16 y C5DC).

#### **3.1. Estudio de la imprecisión e inexactitud**

De acuerdo con las recomendaciones del documento EP15-A publicadas por el NCCLS,<sup>67</sup> se calculó el valor de la imprecisión intra-ensayo ( $S_{intra}$ ) según la siguiente fórmula:

$$S_{intra} = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D \sum_{i=1}^n (x_{di} - \bar{x}_d)^2}{D(n-1)}}$$

donde n es el número de replicados por día de cada nivel ( $i = 1, \dots, n$ );

D es el número total de días ( $d = 1, \dots, D$ );

$x_{di}$  son los resultados de los replicados del día d;

$\bar{x}_d$  es el promedio de los resultados para el nivel dado el día d.

Se realizaron 7 replicados de 4 niveles de material de control de calidad externo (CDC) durante 7 días. Para seleccionar los datos adecuados para el estudio de la imprecisión, se aplicó el criterio de Dixon, evaluando todos los replicados de cada serie analítica en comparación con el valor Q tabulado para el número de replicados efectuados. De una primera estimación de la desviación estándar intra-ensayo y de la total, se observó que la variación inter-ensayo no era una componente importante de la imprecisión total del método (puesto que la desviación estándar intra-ensayo suponía más de 2/3 de la total). Por tanto, según la recomendación del documento EP15, se eligió un protocolo de 3 replicados



## Parte experimental

durante 3 días y se utilizaron los primeros 3 replicados de cada día que no presentaban ningún valor aberrante.

Se compararon los valores de  $S_{\text{intra}}$  con el valor considerado aceptable para la repetibilidad del método. Según la recomendación C50-P del CLSI acerca de sistemas de tandem masas aplicados a la práctica clínica, se consideraron adecuados un  $CV_{\text{intra}}$  y un  $CV_{\text{total}}$  del 20%.<sup>68</sup>

Para estimar  $\sigma_{\text{intra}}$ , tomando como aceptable dicho CV del 20%, se tuvo en cuenta la media de promedios intraensayo para cada parámetro, aplicando la fórmula:  $\sigma_{\text{intra}} = CV \cdot \bar{\bar{x}}_d$ . Se consideró que la imprecisión intraensayo era adecuada si  $S_{\text{intra}} < \sigma_{\text{intra}}$ . Los resultados de imprecisión de las carnitinas que cumplieron el criterio seleccionado para los 4 niveles estudiados (C2, C3, C5 y C16) se muestran de la Tabla 10 a la Tabla 13. En dichas tablas, así como en las siguientes (Tabla 15 a Tabla 19), se representa la media de los resultados obtenidos para cada nivel en el presente estudio (Media global) y por el resto de laboratorios con el mismo método (Media RL), así como la desviación porcentual de nuestros resultados, con respecto al valor teórico aportado por el CDC (%DVT) y con respecto al resto de laboratorios (%DRL).

		Acetil (C2)			
		CDC561	CDC562	CDC563	CDC564
Valor teórico		-	-	-	-
Día 1		16,5	15,48	14,7	13,9
		16,2	16,34	15,9	15,7
		18,2	15,64	15,5	15,2
Día 2		16,5	14,6	13,7	15,2
		14,6	13,9	14,9	15,0
		16,2	15,8	14,8	14,4
Día 3		14,6	13,8	13,0	14,0
		13,1	13,2	12,8	15,2
		13,5	12,1	11,4	14,3
Inexactitud e imprecisión según EP-15		Resultados Globales			
Análisis inexactitud global	Media global	15,50	14,53	14,08	14,75
	% DVT	-	-	-	-
	Media RL	-	-	-	-
Análisis imprecisión intra	% DRL	-	-	-	-
	$S_{\text{intra}}$	1,13	0,77	0,89	0,71
Análisis imprecisión global	$\sigma_{\text{intra}}$	3,10	2,91	2,82	2,95
	$S_{\text{total}}$	2,30	1,63	1,83	0,76
	$\sigma_{\text{Total}}$	3,10	2,91	2,82	2,95

Tabla 10. Estudio de imprecisión e inexactitud de C2

*Parte experimental*

		Propionil (C3)			
		CDC561	CDC562	CDC563	CDC564
Valor teórico		2,1	6,0	11,5	17,0
Día 1		2,4	5,64	10,51	18,43
		2,4	5,53	11,37	16,00
		2,5	5,85	11,31	19,27
Día 2		2,3	5,22	11,13	17,12
		2,1	5,36	12,76	19,92
		2,3	5,07	12,10	16,89
Día 3		3,0	6,70	11,37	17,16
		2,0	6,36	11,85	18,26
		2,1	5,85	11,90	15,24
Inexactitud e imprecisión según EP-15		Resultados Globales			
Análisis inexactitud global	Media global	2,35	5,73	11,59	17,59
	% DVT	12,0%	-4,8%	0,8%	3,2%
	Media RL	2,07	5,42	10,28	14,94
	% DRL	13,6%	5,7%	12,7%	17,7%
Análisis imprecisión intra	S <sub>intra</sub>	0,29	0,32	0,72	1,54
	σ <sub>intra</sub>	0,47	1,15	2,32	3,52
Análisis imprecisión global	S <sub>total</sub>	0,30	0,60	0,76	1,34
	σ <sub>Total</sub>	0,47	1,15	2,32	3,52

Tabla 11. Estudio de imprecisión e inexactitud de C3

		Palmitoil (C16)			
		CDC561	CDC562	CDC563	CDC564
Valor teórico		0,99	4,69	8,10	11,98
Día 1		0,93	4,75	6,92	11,69
		0,88	4,53	8,59	12,21
		0,97	4,07	8,10	10,66
		0,92	3,96	7,38	11,35
Día 2		0,83	3,52	8,29	10,90
		0,93	4,48	8,16	11,37
		0,93	4,36	6,48	11,97
		0,78	3,88	8,18	13,16
Día 3		0,63	4,82	7,48	12,70
Inexactitud e imprecisión según EP-15		Resultados Globales			
Análisis inexactitud global	Media global	0,87	4,26	7,73	11,78
	% DVT	-12,4%	-9,1%	-4,6%	-1,7%
	Media RL	1,01	4,56	8,20	11,60
Análisis imprecisión intra	% DRL	-14,2%	-6,6%	-5,7%	1,5%
	S <sub>intra</sub>	0,096	0,436	0,755	0,593
	σ <sub>intra</sub>	0,173	0,852	1,546	2,356
Análisis imprecisión global	S <sub>total</sub>	0,110	0,432	0,689	0,882
	σ <sub>Total</sub>	0,173	0,852	1,546	2,356

Tabla 12. Estudio de imprecisión e inexactitud de C16

## Parte experimental

		Isovaleril (C5)			
		CDC561	CDC562	CDC563	CDC564
Valor teórico		0,17	0,69	1,63	3,27
Día 1		0,18	0,56	1,34	3,16
		0,14	0,53	1,69	2,75
		0,18	0,62	1,47	3,12
Día 2		0,20	0,60	1,35	3,47
		0,17	0,52	1,71	3,14
		0,17	0,59	1,72	2,89
Día 3		0,16	0,61	1,47	3,14
		0,15	0,55	1,54	2,96
		0,14	0,60	1,44	2,95
Inexactitud e imprecisión según EP-15		Resultados Globales			
Análisis inexactitud global	Media global	0,16	0,58	1,53	3,07
	% DVT	-3,7%	-16,6%	-6,4%	-6,2%
	Media RL	0,20	0,70	1,67	3,15
Análisis imprecisión intra	% DRL	-18,2%	-17,8%	-8,7%	-2,7%
	S <sub>intra</sub>	0,018	0,050	0,170	0,225
	σ <sub>intra</sub>	0,033	0,115	0,305	0,613
Análisis imprecisión global	S <sub>total</sub>	0,021	0,054	0,166	0,201
	σ <sub>Total</sub>	0,033	0,115	0,305	0,613

Tabla 13. Estudio de imprecisión e inexactitud de C5

En aquellos casos en que se encontraron imprecisiones superiores a la deseable (C4, C6, C8, C10, C14, C5DC), se evaluó la significación estadística de la diferencia observada mediante un contraste con una distribución de  $\chi^2$ .

Para ello, se calculó el valor de verificación de las diferencias observadas, según la

fórmula  $\frac{\sigma_{intra} \sqrt{C}}{\sqrt{gl}}$ , siendo C el valor de la distribución  $\chi^2$  para un valor porcentual de

$1 - \frac{\alpha}{k}$  correspondiente a un porcentaje  $\alpha$  de falso rechazo y k niveles estudiados. Los

grados de libertad para el cálculo de la precisión intra-ensayo se estimaron según

$gl = D(n - 1)$ , donde D es el número de días del estudio de imprecisión y n el número de

réplicas, de modo que, en el presente caso los grados de libertad fueron:  $gl = 3 \cdot (3 - 1) = 6$ .

Así pues, con 4 niveles de concentración estudiados y eligiendo un 5% como porcentaje de

falso rechazo, el valor porcentual  $\left(1 - \frac{\alpha}{k}\right)$  es del 98.75% lo que, para 6 grados de libertad

y un error  $\alpha$  del 5%, corresponde a un valor  $C = 16.24$  según la distribución de  $\chi^2$ . Con este factor, se calculó el valor de verificación para cada nivel:

## Parte experimental

$$V_{\text{int ra}} = \frac{\sigma_{\text{int ra}} \sqrt{C}}{\sqrt{gl}} = \frac{\sigma_{\text{int ra}} \sqrt{16.24}}{\sqrt{6}} = \sigma_{\text{int ra}} \cdot 1.645$$

Una vez obtenido este valor para cada carnitina, se comparó el resultado de  $S_{\text{intra}}$  con el valor de verificación de la imprecisión intraensayo,  $V_{\text{intra}}$ . En la Tabla 14 se resumen los valores de verificación para las carnitinas que no mostraron adecuada imprecisión intraensayo, principalmente en los niveles más bajos de concentración estudiados.

	C4	C6	C8	C10	C14	C5DC
$V_{\text{intra}}^*$	0.087	0.014	0.025	0.034	0.045	0.012

\* Para  $C=1.645$  y  $6 \text{ gl}$

**Tabla 14. Valores de verificación de las imprecisiones intraensayo de C4, C6, C8, C10 y C14.**

De esta comparación se dedujo que las desviaciones observadas para la imprecisión intraensayo respecto al valor considerado adecuado sólo fueron estadísticamente significativas en el caso de la C6 (Tabla 15) y de la C5DC (Tabla 16).

		Hexanoil (C6)			
		CDC561	CDC562	CDC563	CDC564
Valor teórico		0,04	0,59	1,04	2,64
Día 1		0,03	0,54	1,04	2,73
		0,02	0,60	1,11	2,69
		0,04	0,59	1,20	2,74
Día 2		0,03	0,61	1,08	2,77
		0,04	0,60	0,85	2,56
		0,08	0,64	0,84	2,61
Día 3		0,06	0,46	0,98	2,94
		0,02	0,50	0,84	2,86
		0,06	0,51	1,16	3,21
Inexactitud e imprecisión según EP-15		Resultados Globales			
Análisis inexactitud global	Media global	0,04	0,56	1,01	2,79
	% DVT	6,3%	-4,9%	-2,8%	5,7%
	Media RL	0,06	0,50	0,98	2,31
Análisis imprecisión intra	% DRL	-29,1%	12,2%	3,2%	20,9%
	$S_{\text{intra}}$	0,020	0,060	0,143	0,197
	$\sigma_{\text{intra}}$	0,009	0,116	0,228	0,551
Análisis imprecisión global	$S_{\text{total}}$	0,019	0,076	1,073	1,668
	$\sigma_{\text{Total}}$	0,009	0,116	0,228	0,551

**Tabla 15. Estudio de imprecisión e inexactitud de C6**

## Parte experimental

		Glutaril (C5DC)			
		CDC561	CDC562	CDC563	CDC564
Valor teórico		0,05	0,25	0,46	0,84
Día 1		0,06	0,23	0,37	0,65
		0,02	0,18	0,40	0,71
		0,03	0,22	0,41	0,72
		0,04	0,19	0,38	0,55
Día 2		0,02	0,14	0,39	0,71
		0,03	0,22	0,36	0,67
		0,03	0,25	0,36	0,83
		0,04	0,18	0,41	0,85
Día 3		0,04	0,21	0,34	0,68
		0,04	0,21	0,34	0,68
Inexactitud e imprecisión según EP-15					
		Resultados Globales			
Análisis inexactitud global	Media global	0,04	0,20	0,38	0,71
	% DVT	-29,3%	-19,2%	-17,4%	-15,7%
	Media RL	0,05	0,20	0,36	0,66
Análisis imprecisión intra	% DRL	-29,3%	1,0%	5,5%	7,3%
	S <sub>intra</sub>	0,014	0,033	0,027	0,076
	σ <sub>intra</sub>	0,007	0,040	0,076	0,142
Análisis imprecisión global	S <sub>total</sub>	0,013	0,032	0,025	0,097
	σ <sub>Total</sub>	0,007	0,040	0,076	0,142

Tabla 16. Estudio de imprecisión e inexactitud de C5DC

El resto de las carnitinas no manifestaron, pues, imprecisiones intraensayo estadísticamente significativas (Tabla 17 a Tabla 20).

		Butiril (C4)			
		CDC561	CDC562	CDC563	CDC564
Valor teórico		0,24	1,23	2,54	4,82
Día 1		0,32	1,17	2,42	5,27
		0,24	1,16	2,65	4,80
		0,22	1,09	2,92	5,19
Día 2		0,26	1,12	2,46	5,26
		0,22	0,99	2,89	5,03
		0,25	1,17	2,54	4,53
Día 3		0,27	1,18	2,52	5,70
		0,41	1,01	2,80	4,98
		0,19	1,23	2,70	5,13
Inexactitud e imprecisión según EP-15		Resultados Globales			
Análisis inexactitud global	Media global	0,26	1,13	2,65	5,10
	% DVT	10,1%	-8,5%	4,5%	5,7%
	Media RL	0,31	1,25	2,63	4,79
Análisis imprecisión intra	% DRL	-14,7%	-10,0%	0,9%	6,4%
	S <sub>intra</sub>	0,07	0,09	0,21	0,34
	σ <sub>intra</sub>	0,05	0,23	0,53	1,02
Análisis imprecisión global	S <sub>total</sub>	0,06	0,08	0,17	0,32
	σ <sub>Total</sub>	0,05	0,23	0,53	1,02

Tabla 17. Estudio de imprecisión e inexactitud de C4

*Parte experimental*

		Octanoil (C8)			
		CDC561	CDC562	CDC563	CDC564
Valor teórico		0,06	0,62	1,13	2,82
Día 1		0,08	0,66	1,23	2,53
		0,08	0,82	1,37	3,10
		0,05	0,61	1,19	2,82
Día 2		0,05	0,61	1,07	2,92
		0,09	0,48	1,26	3,35
		0,05	0,50	1,18	2,73
Día 3		0,09	0,64	1,30	3,29
		0,09	0,66	1,10	3,23
		0,10	0,67	1,15	2,71
Inexactitud e imprecisión según EP-15		Resultados Globales			
Análisis inexactitud global	Media global	0,08	0,63	1,21	2,96
	% DVT	25,2%	1,1%	6,7%	5,1%
	Media RL	0,08	0,62	1,16	2,75
Análisis imprecisión intra	% DRL	-6,1%	1,1%	4,0%	7,8%
	$S_{intra}$	0,023	0,080	0,091	0,285
	$\sigma_{intra}$	0,015	0,124	0,246	0,585
Análisis imprecisión global	$S_{total}$	0,021	0,106	0,100	0,291
	$\sigma_{Total}$	0,015	0,124	0,246	0,585

Tabla 18. Estudio de imprecisión e inexactitud de C8

		Miristoil (C14)			
		CDC561	CDC562	CDC563	CDC564
Valor teórico		0,12	0,54	1,71	3,35
Día 1		0,18	0,52	1,39	2,76
		0,13	0,47	1,54	3,05
		0,14	0,43	1,50	2,39
Día 2		0,10	0,39	1,17	2,81
		0,15	0,34	1,50	2,59
		0,21	0,41	1,36	2,51
Día 3		0,12	0,42	1,29	2,87
		0,10	0,35	1,64	2,74
		0,12	0,45	1,50	3,03
Inexactitud e imprecisión según EP-15		Resultados Globales			
Análisis inexactitud global	Media global	0,14	0,42	1,43	2,75
	% DVT	15,1%	-22,0%	-16,2%	-17,9%
	Media RL	0,13	0,55	1,61	3,09
Análisis imprecisión intra	% DRL	6,3%	-23,4%	-11,0%	-11,0%
	$S_{intra}$	0,035	0,045	0,145	0,229
	$\sigma_{intra}$	0,028	0,084	0,287	0,550
Análisis imprecisión global	$S_{total}$	0,037	0,060	0,142	0,223
	$\sigma_{Total}$	0,028	0,084	0,287	0,550

Tabla 19. Estudio de imprecisión e inexactitud de C14

## Parte experimental

		Decanoil (C10)			
		CDC561	CDC562	CDC563	CDC564
Valor teórico		0,08	0,40	1,00	2,08
Día 1		0,14	0,55	1,24	2,10
		0,07	0,54	1,52	2,89
		0,12	0,39	1,49	2,35
Día 2		0,08	0,45	1,11	2,15
		0,12	0,39	1,46	2,84
		0,08	0,48	1,48	2,61
Día 3		0,12	0,50	0,98	2,25
		0,11	0,30	1,37	2,84
		0,08	0,46	1,19	2,29
Inexactitud e imprecisión según EP-15		Resultados Globales			
Análisis inexactitud global	Media global	0,10	0,45	1,32	2,48
	% DVT	28,7%	12,8%	31,6%	19,2%
	Media RL	0,09	0,39	1,00	1,95
Análisis imprecisión intra	% DRL	14,4%	15,7%	31,6%	27,1%
	S <sub>intra</sub>	0,029	0,083	0,188	0,360
	σ <sub>intra</sub>	0,021	0,090	0,263	0,496
Análisis imprecisión global	S <sub>total</sub>	0,322	0,675	1,157	1,602
	σ <sub>Total</sub>	0,021	0,090	0,263	0,496

Tabla 20. Estudio de imprecisión e inexactitud de C10

La imprecisión total se calculó estimando en primer lugar, un término de la varianza, B, para la media diaria de cada nivel ensayado, según la siguiente fórmula:

$$B = \frac{\sum_{d=1}^D (\bar{x}_d - \bar{\bar{x}})^2}{D-1}, \text{ donde: } \bar{x}_d \text{ es el promedio de todos los resultados en el día } d \text{ y } \bar{\bar{x}} \text{ es el promedio de todos los resultados para cada nivel de concentración.}$$

Se calculó la desviación estándar total a partir de la fórmula,  $S_{total} = \sqrt{\frac{n-1}{n} S_{intra}^2 + B}$  donde n es el número de replicados por ensayo.

Análogamente al cálculo realizado para la imprecisión intraensayo, para evaluar la imprecisión total del método, se aplicó como valor de verificación de las diferencias

observadas, el calculado según la fórmula  $V_{total} = \frac{\sigma_{total}}{\sqrt{T}} \sqrt{C}$ , donde

$$T = \frac{((n-1)S_{intra}^2 + nB)^2}{\left(\frac{n-1}{D}\right)S_{intra}^4 + \frac{n^2 B^2}{D-1}}, \quad \sigma_{total} = CV_{total} \cdot \bar{\bar{x}} \text{ y } C \text{ es el percentil } \left(1 - \frac{\alpha}{k}\right) \text{ de la}$$

distribución  $\chi^2$  para T grados de libertad.

## Parte experimental

En la Tabla 21 se resumen los valores de verificación para las carnitinas que no mostraron adecuada imprecisión total.

	Nivel CDC	T	C*	V <sub>total</sub>
<b>C4</b>	561	8	19.48	0.085
<b>C6</b>	561	8	19.48	0.013
	563	4	12.76	0.400
	564	8	19.48	0.877
<b>C8</b>	561	8	19.48	0.024
<b>C14</b>	561	7	17.88	0.043
<b>C5DC</b>	561	8	19.48	0.011
<b>C10</b>	561	8	19.48	0.033
	562	8	19.48	0.141
	563	7	17.88	0.412
	564	6	16.24	0.797

\*C es el percentil  $\left(1 - \frac{\alpha}{k}\right)$  de la distribución  $\chi^2$  para T grados de libertad, siendo  $\alpha$  el % de falso rechazo admitido y k el n° de niveles

**Tabla 21. Valores de verificación de la imprecisión total de C4, C6, C8, C10 y C14.**

Las imprecisiones totales fueron estadísticamente significativas para C6 y C10.

Para evaluar la inexactitud, se compararon los resultados medidos con los teóricos aportados por el CDC para cada nivel de concentración, así como con los resultados del resto de los participantes del programa.

### 3.2. Linealidad

La linealidad del ensayo se determinó analizando materiales de control externo, con valores teóricos asignados, suministrados por el CDC y exentas de posibles sustancias interferentes que habrían invalidado el experimento. Se procesaron 4 niveles de control y una dilución 1/10 del nivel más bajo de ellos, por quintuplicado y en 5 días diferentes. Se representó la media de los resultados obtenidos para los parámetros evaluados frente a los valores teóricos, y se efectuó un análisis de regresión polinómica, siguiendo como guía las recomendaciones para el estudio de la linealidad elaboradas por el CLSI (EP6-A).<sup>69</sup>

En primer lugar, se efectuaron pruebas de normalidad y homocedasticidad de la distribución de los replicados para asegurar que se cumplían los requisitos del análisis de regresión. En todos los casos se observó que los replicados seguían una distribución normal. Sin embargo, la prueba de homogeneidad de varianzas reveló que la variabilidad



### *Parte experimental*

no es constante para los diferentes niveles. El contraste a posteriori demostró que el nivel bajo tiene significativamente una varianza diferente de los demás. Aunque el modelo de regresión lineal es bastante robusto para la violación del supuesto de homocedasticidad, se aplicó una regresión polinómica con el fin de estudiar la relevancia de la posible no linealidad de los datos. Se calculó para cada uno de los coeficientes no lineales el valor

$t_i = \frac{b}{SE_i}$ . Mediante la fórmula  $df = L \cdot R - gl$ , se calcularon los grados de libertad, siendo

L el número de niveles chequeados (en este caso 5), R el número de replicados de cada uno de dichos niveles, y gl el número de grados de libertad consumidos por el análisis de regresión, que equivale al número de coeficientes del modelo de regresión incluyendo el término independiente. En este caso, para una regresión polinómica de tercer grado, es  $L = 5$ ,  $R = 5$ ,  $gl = 4$ , de modo que  $df = 5 \cdot 5 - 4 = 21$ . Se tomó como valor crítico para t el de un contraste bilateral con una incertidumbre de 0.05. Dado que ninguno de los coeficientes no lineales (cuadrático y tercer grado) fue significativo ( $p > 0.05$  para ambos), se consideró comprobada la linealidad del método. En las representaciones gráficas de la Figura 31 a la Figura 39 se pueden observar las rectas obtenidas tras el análisis de regresión lineal para cada uno de los parámetros evaluados en el estudio de linealidad del método.

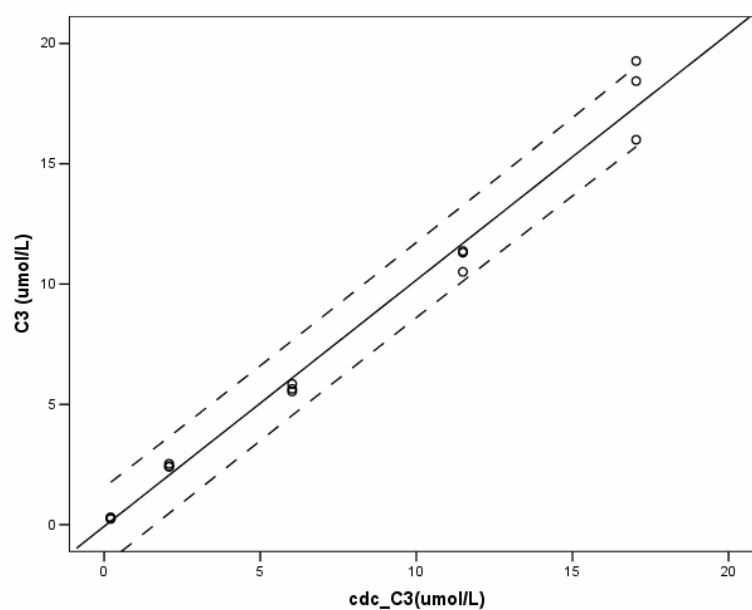
En la Tabla 22 se presentan los coeficientes de la regresión ( $y=a+bx$ ), para cada metabolito incluido en el estudio de la linealidad, así como su grado de significación estadística, el intervalo de confianza del 95% de cada uno de ellos, y los coeficientes de correlación (r) y de determinación ( $r^2$ ).

## Parte experimental

	<b>a</b>	<b>IC95%(a)</b>	<b>b</b>	<b>IC95%(b)</b>	<b>r</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
<b>C3</b>	-0.070*	-0.806 – 0.666	1.024**	0.947 – 1.100	0.992	0.985
<b>C4</b>	-0.035*	-0.16 – 0.09	1.057**	1.007 – 1.107	0.997	0.994
<b>C8</b>	0.049*	-0.053 – 0.151	0.996**	0.923 – 1.070	.992	0.985
<b>C6</b>	-0.003*	-0.036 – 0.029	1.037**	1.011 – 1.062	0.999	0.998
<b>C5</b>	-0.012*	-0.104 – 0.080	0.923**	0.867 – 0.978	0.995	0.990
<b>C14</b>	0.036*	-0.069 – 0.141	0.814**	0.752 – 0.875	0.992	0.984
<b>C10</b>	0.047*	-0.105 – 0.198	1.191**	1.046 – 1.335	0.980	0.961
<b>C16</b>	-0.025*	-0.436 – 0.387	0.966**	0.905 – 1.026	0.995	0.989
<b>C5DC</b>	0.003*	-0.016 – 0.022	0.828**	0.784 – 0.871	0.996	0.993

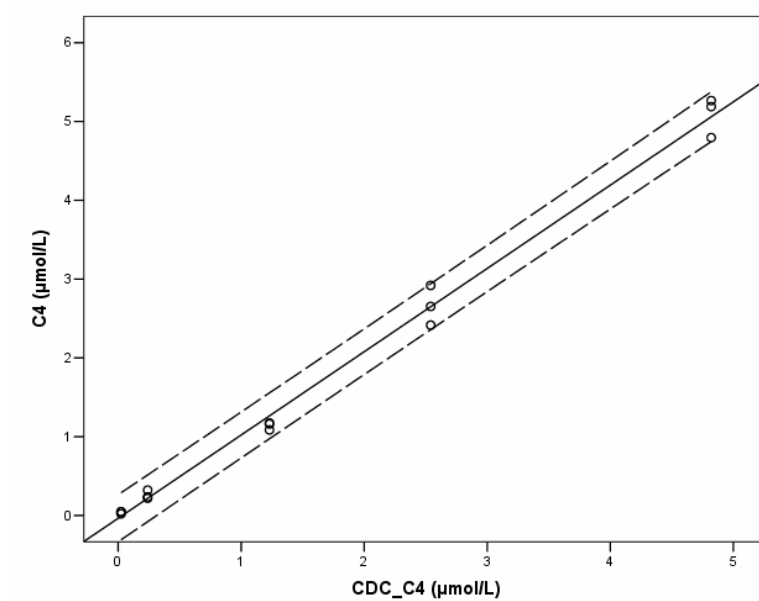
\*NS: No significativo; \*\* p<0.001

**Tabla 22. Resumen de los coeficientes de la regresión para los analitos incluidos en el estudio de la linealidad**

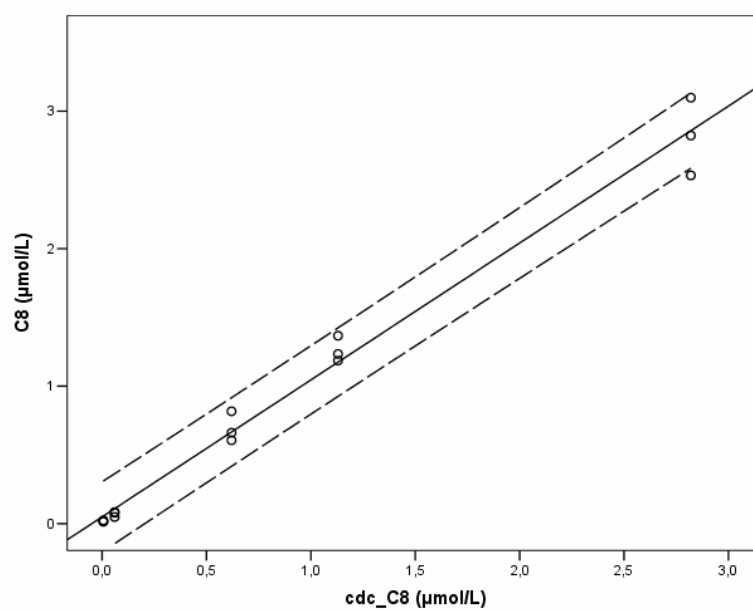


**Figura 31. Linealidad del método para C3 (μmol/L)**

*Parte experimental*

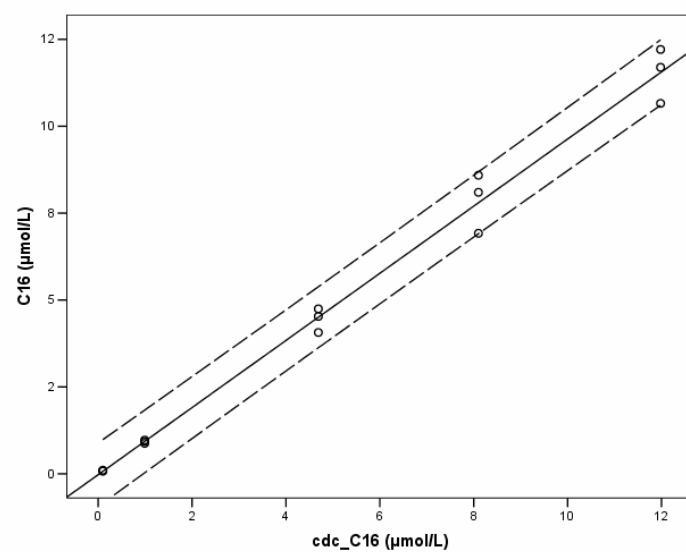


**Figura 32. Linealidad del método para C4 (μmol/L)**

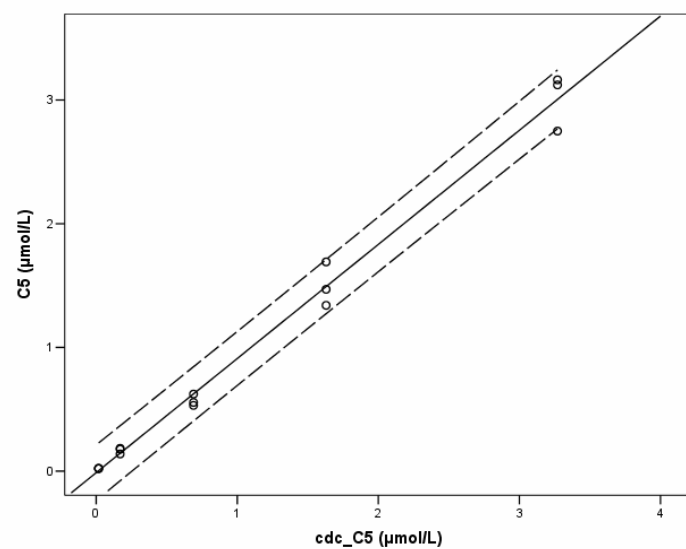


**Figura 33. Linealidad del método para C8 (μmol/L)**

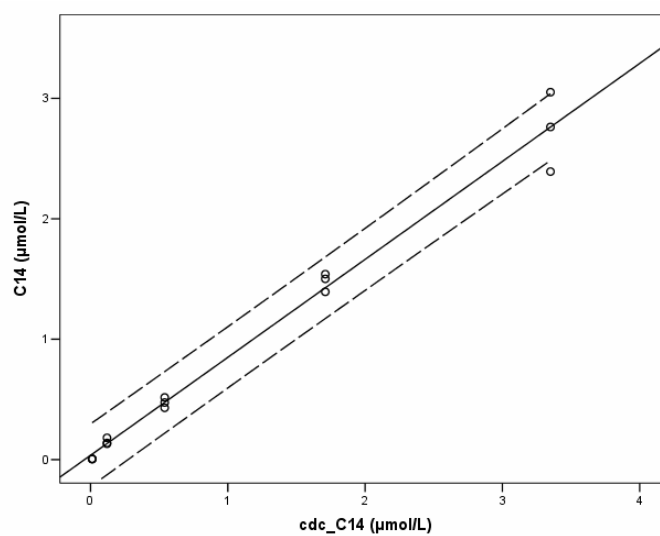
*Parte experimental*



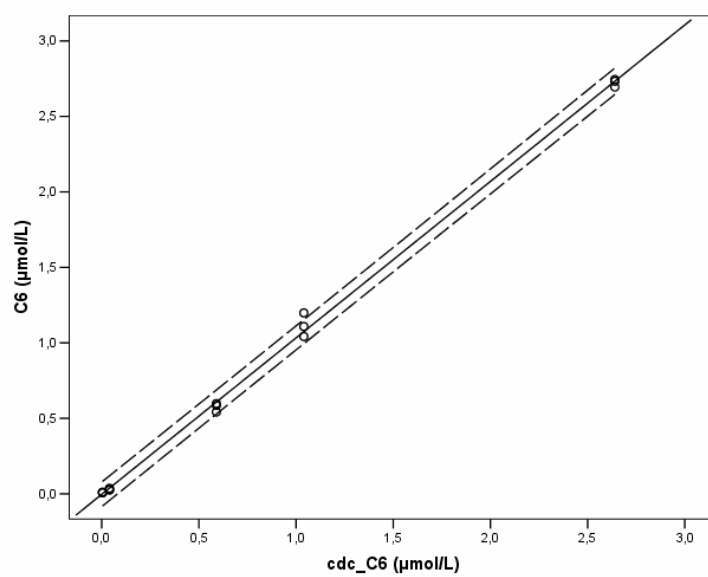
**Figura 34. Linealidad del método para C16 ( $\mu\text{mol/L}$ )**



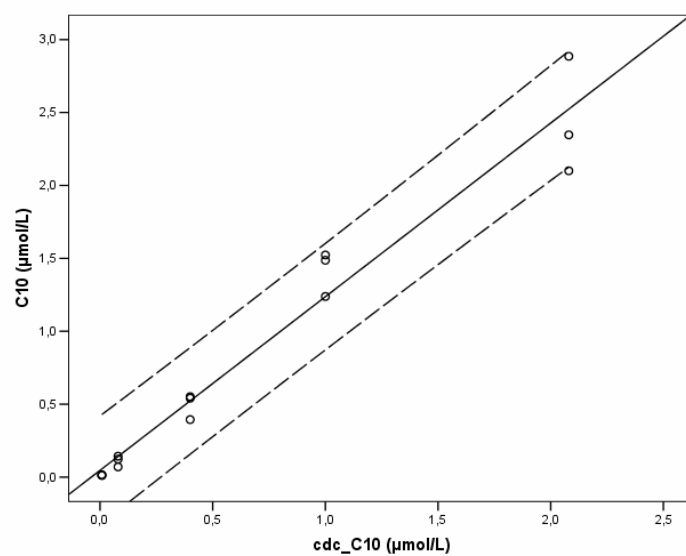
**Figura 35. Linealidad del método para C5 ( $\mu\text{mol/L}$ )**



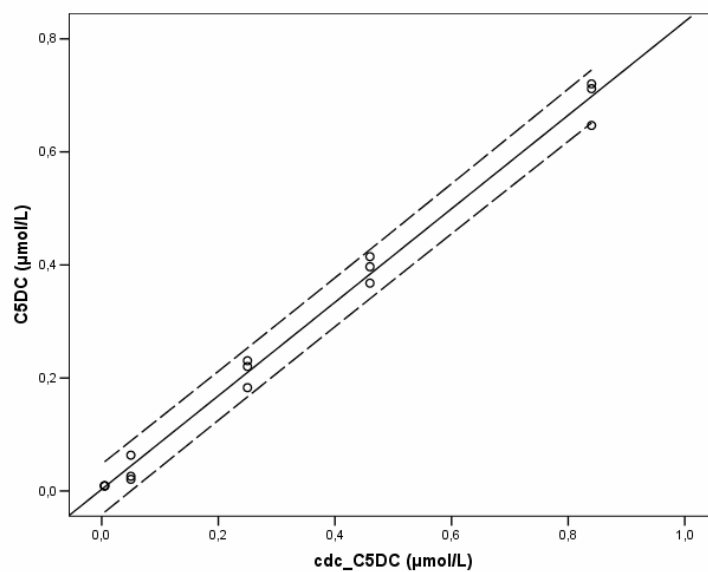
**Figura 36. Linealidad del método para C14 ( $\mu\text{mol/L}$ )**



**Figura 37. Linealidad del método para C6 ( $\mu\text{mol/L}$ )**



**Figura 38. Linealidad del método para C10 ( $\mu\text{mol/L}$ )**

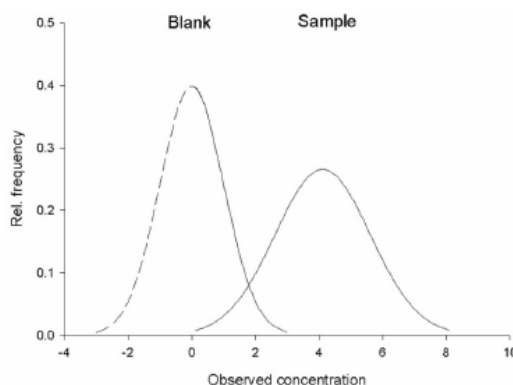


**Figura 39. Linealidad del método para C5DC ( $\mu\text{mol/L}$ )**

### 3.3. Límite de detección

Se calculó el límite de detección (LD) según las recomendaciones del CLSI (EP-17-A).<sup>70</sup> En dicho documento, para determinar el LD, se obtiene la desviación estándar de las medidas muestrales (SD) para medidas repetidas de muestras con una concentración relevantemente baja, del orden del rango comprendido entre el límite de un “blanco” (LB) y aproximadamente 4 veces LB. Se recomienda un mínimo de 60 resultados obtenidos de muestras de baja concentración.

Se analizó una serie de 60 muestras “blanco” que consistían en la fase móvil a la que se añadieron los correspondientes patrones internos. Asimismo, se valoró una serie de 60 muestras con resultados de bajo nivel de concentración en los analitos del estudio, obtenidas por dilución 1/10 del nivel más bajo de control del CDC (nivel al que no se adicionan los constituyentes de interés, de modo que corresponde a concentraciones fisiológicamente normales). Los resultados de las muestras “blanco” se emplearon para determinar una respuesta que es baja y por tanto proporcionar un umbral a partir del cual valores mayores puedan ser interpretados cuantitativamente en muestras con el constituyente de interés. Asimismo, la desviación estándar de la muestra de bajo nivel se usa para seleccionar la concentración a la que las medidas son muy probablemente superiores al valor más alto esperado para los blancos. La distribución de probabilidad de las curvas de densidad de las medidas repetidas de un blanco y una muestra con baja concentración del analito se representan en la Figura 40



**Figura 40. Distribuciones de las concentraciones observadas para el blanco y una muestra de concentración baja del analito. La línea discontinua corresponde a concentraciones negativas indicando que los instrumentos a los que se aplica habitualmente en el laboratorio clínico este tipo de análisis no producen resultados negativos.**

## Parte experimental

El LD acota los resultados que tienen una probabilidad específica de exceder el valor del blanco. Seleccionando un nivel  $\beta$  para el error de tipo II del 5%, el 95% de las medidas excederán el límite del blanco, cuando la concentración de una muestra real sea el LD. El LD es la concentración más baja real cuya distribución corresponde a  $\mu_S - 1.645 \sigma_S$ , donde  $\mu_S$  y  $\sigma_S$  son el promedio y la desviación estándar de la población de las medidas de baja concentración.

En conjunto:

$$\mu_S = LD = LB + 1.645 \sigma_S.$$

Si la distribución de los valores del blanco es normal, entonces  $LB = \mu_B + 1.645 \sigma_B$  y por consiguiente  $LD = \mu_B + 1.645 \sigma_B + 1.645 \sigma_S$  (Ecuación 1).

En el caso del presente trabajo, las distribuciones de blancos y muestras de bajo nivel fueron gaussianas para todos los parámetros evaluados. Asimismo, la prueba de homogeneidad de varianzas demostró que la variabilidad de ambas distribuciones no era significativamente diferente, por lo que se estimó el LD de forma paramétrica (según la ecuación 1). No se observaron valores aberrantes, según el criterio de Reed.<sup>71</sup> Para el cálculo del error estándar de la estimación del LD, se aplicó la fórmula simplificada propuesta por Linnet.<sup>72</sup>

Los límites de detección (en  $\mu\text{mol/L}$ ), junto con el error estándar de su estimación, se resumen en la Tabla 23

	<b>C0</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C8</b>	<b>C16</b>	<b>C5</b>	<b>C14</b>	<b>C6</b>	<b>C10</b>	<b>C5DC</b>
<b>LD</b>	0,537	0,102	0,079	0,044	0,023	0,022	0,021	0,011	0,035	0,021	0,019
<b>SE (LD)</b>	0,032	0,007	0,005	0,003	0,001	0,002	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001

**Tabla 23. Límites de detección de los diferentes parámetros de estudio del método**

Para calcular el límite de cuantificación, se calculó el sesgo entre la media estimada para el valor de nivel bajo del control y el valor teórico del mismo. Se estimó el error total como  $\text{Error Total} = \text{Sesgo} + 2 \times \text{SD}$  y se verificó la gaussianidad de los errores. Una vez verificada, se asumió como válido un error total de  $\pm 0.1$ . Como el error total estimado fue inferior al considerado como adecuado en todos los casos, se asumió que el Límite de cuantificación es igual al LD.



#### ***4. Estudio para la introducción de nuevos patrones de acilcarnitinas marcadas isotópicamente***

La cuantificación de acilcarnitinas está basado en un método de dilución isotópica con patrones internos marcados. Para ello, se usan patrones marcados suministrados por Cambridge Isotope Laboratories (CIL), denominados “Set B de acilcarnitinas” y que contiene carnitina libre, acetilcarnitina, propionilcarnitina, butiril carnitina, isovalerilcarnitina, octanoilcarnitina, miristoilcarnitina, palmitoilcarnitina.

Esta mezcla de patrones isotópicamente marcados, no contiene todas las acilcarnitinas que son cuantificadas, de modo que, acilcarnitinas como C6, C10, C12 y C18 se cuantifican respecto a su análogo más próximo, en este caso.

C6-----D<sub>3</sub>-C8

C10-----D<sub>3</sub>-C8

C12-----D<sub>9</sub>-C14

C18-----D<sub>3</sub>-C16

Con el fin de verificar la posible mejora del método de cuantificación de estas y otras acilcarnitinas, se adquirieron (Dr. German T. Brink del Hospital Universitario de Ámsterdam) cuatro patrones trideuterados de hexanoilcarnitina, decanoilcarnitina, dodecanoilcarnitina y estearoilcarnitina, para estudiar la posibilidad de introducir los mismos como complementarios a los patrones de CIL.

#### **4.1. Patrones preparados**

##### **4.1.1. Reactivos y material**

- Set B de acilcarnitinas CIL.
- Hidrocloruro de hexanoilcarnitina trideuterada.
- Hidrocloruro de decanoilcarnitina trideuterada.
- Hidrocloruro de dodecanoilcarnitina trideuterada.
- Hidrocloruro de estearoilcarnitina trideuterada.
- Metanol Lichrosolv (Merck) grado cromatografía de líquidos.

#### **4.1.2. Disoluciones de patrones**

En una primera etapa, se prepara una disolución de concentración final 7.6  $\mu\text{M}$  análoga a las otras acilcarnitinas presentes en el set B, con la cual se reconstituye el vial de CIL, de modo que sólo tendríamos que preparar la disolución trabajo de rutina. Ya que para llegar a esa concentración de acilcarnitinas habría que pesar del orden de 0.1 mg, se prepara previamente una disolución madre, la cual será diluida hasta alcanzar dicha concentración.

##### ***a) Disolución “compuesta” de patrones de acilcarnitinas deuteradas C6, C10, C12 y C18***

Se prepara previamente una disolución madre 76  $\mu\text{M}$  en 500 mL de metanol de alta pureza conteniendo las cuatro acilcarnitinas. De ésta, se toman 10 mL y se llevan a 100 mL con metanol. Con 1 mL se reconstituye un vial liofilizado de acilcarnitinas de CIL. Las disoluciones se conservan congeladas a  $-30^\circ\text{C}$ .

##### ***b) Disoluciones de patrones individuales de acilcarnitinas deuteradas (C6, C10, C12 y C18)***

Se prepara una disolución madre de 1520  $\mu\text{M}$  en 25 mL de metanol para cada una de las acilcarnitinas. Para cada disolución de acilcarnitinas, se diluyen 50  $\mu\text{L}$  de la disolución hasta 10 mL. Las disoluciones se conservan congeladas a  $-30^\circ\text{C}$ .

#### **4.2. Estudio para la pureza de los patrones de acilcarnitinas marcadas**

Los patrones deuterados utilizados para la cuantificación de acilcarnitinas tienen que ser de gran pureza, o en el caso de existir tales impurezas, ser prácticamente despreciable su señal de modo que se confunda con la línea base y no contribuya de forma significativa a la cuantificación. Se realizó un estudio de la pureza de los patrones marcados, tanto de los utilizados rutinariamente (CIL) como de los adquiridos de acilcarnitinas, con los cuales preparamos la disolución “compuesta”.

Para realizar esta experiencia nos basamos en el estudio de la pureza del ácido orótico descrito por Rashed,<sup>73</sup> donde se calcula la pureza isotópica de este ácido en relación con las intensidades de señal para el deuterado y no deuterado.

#### **4.2.1. Pureza isotópica del estándar de acilcarnitinas de CIL y de los patrones deuterados adquiridos**

Se realiza una serie de experiencias para determinar la pureza de los patrones utilizados rutinariamente en la cuantificación, determinando así la pureza isotópica del mismo. El porcentaje de acilcarnitina no marcada isotópicamente puede ser calculado utilizando una sencilla fórmula, donde relacionamos la intensidad de la acilcarnitina no marcada (AC) y la acilcarnitina marcada (D-AC) multiplicado por 100. Así, el porcentaje de acilcarnitina no marcada frente a la acilcarnitina marcada es:

$$\% \text{Acilcarnitina no marcada} = \frac{\text{Intensidad de ACx}}{\text{Intensidad de D - ACx}} \times 100$$

Se realizan tres experiencias, calculando a partir de ellas el porcentaje de acilcarnitina de i carbonos no marcada referente a la acilcarnitina marcada, obteniendo posteriormente mediante una resta la pureza isotópica.

<b>Acilcarnitina</b>	<b>% ACx exp.1</b>	<b>% ACx exp.2</b>	<b>% ACx exp.3</b>	<b>% ACx media</b>	<b>% Pureza isotópica</b>
C0	0.68	0.77	1.2	0.88	99.12
C2	2.4	5.2	6.4	4.7	95.3
C3	3.4	8.0	11	7.5	92.5
C4	1.9	3.7	4.6	3.4	96.6
C5	4.4	11	14	4.2	95.8
C8	1.7	3.4	7.8	4.3	95.7
C14	0.76	1.3	3.0	1.7	98.3
C16	0.27	0.76	0.52	0.52	99.48

**Tabla 24. Porcentaje de acilcarnitinas no deuteradas para cada uno de los componentes de CIL para tres experiencias, valor medio de AC<sub>x</sub> y pureza de la acilcarnitina deuterada.**

Según los resultados obtenidos, el estándar de acilcarnitinas del CIL, tiene una pureza isotópica buena. En el caso de C2, C3, C5 y C8, principalmente en C3, es un poco baja pero no es relevante.

Si realizamos el mismo estudio de pureza isotópica para el estándar “compuesto”, en este caso se realizará para C6, C10, C12 y C18, utilizando la fórmula anterior mediante tres experiencias se evalúa el porcentaje de acilcarnitina libre y con ello, la pureza isotópica (Tabla 25).

## Parte experimental

Acilcarnitina	% ACx exp.1	% ACx exp. 2	% ACx exp. 3	% Acx medio	% Pureza isotópica
C6	2.2	6.9	4.8	4.6	95.4
C10	1.9	2.7	2.3	2.3	97.7
C12	0.40	1.9	1.7	1.3	98.7
C18	--	1.8	0.35	1.1	99.9

**Tabla 25. Estudio de la pureza isotópica para los patrones de acilcarnitinas C6, C10, C12 y C18 nuevos mediante tres experiencias, obteniendo el valor medio de impureza y la correspondiente pureza del patrón.**

Según los resultados, la pureza isotópica de los nuevos patrones es adecuada para ser usados como tales por superar todos ellos el 95% de pureza. El más puro es el de C18 y el menos puro el de C6.

### **4.2.2. Pureza relativa de los patrones de acilcarnitinas deuterados nuevos respecto a los patrones de referencia del CIL**

Tras el análisis de la pureza isotópica, realizamos un estudio de la pureza relativa al estándar utilizado habitualmente en el laboratorio (CIL). Por ello, con el fin de conocer su contenido de estas otras carnitinas, se hacen una serie de tres experiencias donde analizaremos nuestro estándar CIL y el estándar preparado en la disolución “compuesta”, tanto sobre papel S&S 2992 como en ausencia del mismo. Para ello, se han preparado las disoluciones como las de trabajo rutinario, esto es, diluyendo 1:200 en metanol, y añadiendo 100 µL en cada pocillo de microtitulación. Las medidas en cada caso se hacen por duplicado y se calcula la media de ambas.

Con los valores de intensidad, se calcula el porcentaje relativo de señal de acilcarnitina, tanto deuterada como no deuterada, del patrón problema frente a la señal de la acilcarnitina deuterada correspondiente del CIL, de modo que definimos la impureza relativa para cada acilcarnitina como:

$$\% \text{Impureza relativa} = \frac{\text{Intensidad de AC o D - AC patrón compuesto}}{\text{Intensidad de D - AC correspondiente de CIL}} \times 100$$

## Parte experimental

Se realizan tres experiencias, una de ellas sin papel. Se realizan los cálculos pertinentes obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla 26.

Acilcarnitina	% Impureza sin papel	% Impureza con papel	% Impureza con papel	% Medio impureza
<b>D C0</b>	0.6	0.7	0.8	0.7
<b>C0</b>	2.3	3.5	1.6	2.5
<b>DC2</b>	2.2	4.9	4.1	<b>4.7</b>
<b>C2</b>	2.6	7.2	5.5	<b>5.1</b>
<b>DC3</b>	1.9	6.1	4.0	<b>4.0</b>
<b>C3</b>	2.5	9.7	6.1	<b>6.1</b>
<b>DC4</b>	1.9	2.5	2.3	2.2
<b>C4</b>	1.8	3.2	5.3	3.4
<b>DC5</b>	1.6	4.5	2.3	<b>8.4</b>
<b>C5</b>	3.2	13	10.2	<b>8.8</b>
<b>C6*</b>	2.6	7.7	4.3	<b>4.9</b>
<b>DC8</b>	2.6	8.4	3.5	<b>4.8</b>
<b>C8</b>	1.2	8.1	4.7	<b>4.7</b>
<b>C10*</b>	2.6	3.7	2.0	2.8
<b>C12#</b>	0.5	2.3	1.2	1.3
<b>DC14</b>	1.1	1.7	1.0	1.3
<b>C14</b>	0.5	2.0	1.1	1.2
<b>DC16</b>	0.7	1.2	0.4	0.8
<b>C16</b>	0.6	1.2	0.7	0.8
<b>C18+</b>	-	0.2	0.7	0.4
<b>C14:1#</b>	0.6	1.4	1.0	1.0
<b>C16:1+</b>	0.2	1.0	0.6	0.7

\*Medido frente D-C8

#Medido frente D-C14

+Medido frente D-C16

**Tabla 26. Resultados del estudio de impureza relativa de los estándares adquiridos frente al CIL.**

Los datos marcados son los más relevantes. Como se puede observar, existen otras acilcarnitinas, tanto deuteradas como no deuteradas, en nuestros nuevos patrones, lo que se pone de manifiesto cuando los medimos frente a los del CIL. Es interesante la aportación a C2, C3, C5 y C8, aumentando tanto la señal deuterada como la no deuterada, traduciéndose en un mayor ruido de fondo y alterando por tanto los valores de cuantificación.

### 4.3. Programa de análisis de datos

Para el tratamiento de datos, precisamos adaptar el programa utilizado (ChemoView®), ya que es necesario introducir cuatro nuevas señales referentes a los cuatro nuevos patrones. Se realizarán dos tipos de procesamiento de datos, unos referentes a la acilcarnitina respectiva

## ***Parte experimental***

del patrón de CIL, y otra referente al patrón objeto de estudio. Tendremos por tanto dos valores de concentraciones, permitiéndonos comparar ambas cantidades y decidir cual es mejor patrón a la hora de cuantificar una determinada acilcarnitina. En el caso de las restantes, es posible identificar cuál es la causante del aumento de intensidades.

### **4.4. Estudio con una disolución compuesta complementaria al patrón de acilcarnitinas del CIL**

#### **4.4.1. Preparación**

A partir de la disolución compuesta de 7.6  $\mu\text{M}$  se decide realizar una serie de estudios con muestras de sangre reales. Para ello, se prepara como la disolución trabajo, es decir, diluyendo 1:200 en metanol. Análogamente, se realiza esta operación con el set B, reconstituido con la disolución compuesta. Preparamos 10 mL para ambas.

#### **4.4.2. Pruebas realizadas**

Se trata de realizar un estudio del aumento de la señal provocado por los nuevos patrones. Se realizarán varias experiencias, de modo que comparando los valores se intentará dilucidar como afecta su introducción. Se hacen medidas de:

- 100  $\mu\text{L}$  de estándar de acilcarnitinas de CIL, en ausencia de papel, por triplicado.
- 100  $\mu\text{L}$  de estándar “compuesto” en ausencia de papel, por duplicado.
- Medidas en 12 muestras de sangre reales con el set B de CIL reconstituido con la disolución compuesta, comparativamente con el patrón utilizado rutinariamente (set B de CIL).

#### **4.4.3. Resultados**

Tras obtener los resultados se calcula la relación de intensidad de señal de acilcarnitina deuterada en disolución compuesta frente a señal deuterada del correspondiente patrón de CIL, y la señal de acilcarnitina no deuterada del patrón “compuesto” frente a señal de fondo de acilcarnitina no deuterada del correspondiente patrón CIL. Con ello, obtenemos un porcentaje relativo de la señal de acilcarnitinas del patrón a introducir frente al patrón

## Parte experimental

rutinario (CIL). Se aplica según sea deuterada o no la acilcarnitina de  $i$  carbonos, una de las siguientes fórmulas:

- Para las acilcarnitinas deuteradas del patrón compuesto:

$$\% \text{Señal D - AC}_i = \frac{\text{Intensidad D - ACx patrón compuesto}}{\text{Intensidad D - ACx patrón de CIL}} \times 100$$

Teniendo en cuenta que en ausencia del marcado en CIL, se tomo aquella acilcarnitina frente a la cual se cuantifica en el análisis convencional.

- Para las acilcarnitinas no deuteradas del patrón compuesto:

$$\% \text{Señal AC}_i = \frac{\text{Intensidad ACx patrón compuesto}}{\text{Intensidad ACx patrón de CIL}} \times 100$$

En este caso, contiene las todas las acilcarnitinas no deuteradas consideradas.

Los resultados se indican en la Tabla 27 siguiente.

Acilcarnitina	Deuterada (% señal)	No deuterada (% señal)
<b>C0</b>	0.68	<b>345</b>
<b>C2</b>	2.2	108
<b>C3</b>	1.9	75
<b>C4</b>	2.0	93
<b>C5</b>	1.6	74
<b>C6</b>	179 *	110
<b>C8</b>	2.6	71
<b>C10</b>	185 *	<b>200</b>
<b>C12</b>	114 #	70
<b>C14</b>	1.1	64
<b>C16</b>	0.72	<b>206</b>
<b>C18</b>	56 +	<b>156</b>

\*medido frente D-C8 #medido frente D-C14 +medido frente D-C18

**Tabla 27. Porcentaje de señal de acilcarnitina del patrón compuesto frente al patrón de acilcarnitinas del CIL.**

Hay un aumento considerable en alguna acilcarnitina no marcada, principalmente de C0, C10 y C16. Aumenta la señal en DC6 y C10, es igual en C12 y la mitad en C18.

Por otra parte se realiza la experiencia de analizar muestras de sangre con el patrón de CIL reconstituido con esta disolución de 7.6  $\mu\text{M}$ , comparativamente con el patrón rutinario. Se observó que afecta en gran medida a algunos parámetros, principalmente a la carnitina

## Parte experimental

libre y a las carnitinas de mayor número de carbonos. Estos resultados pueden verse en la Tabla 28.

	C0	C2	C3	C4	C5	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
CIL	9.83	27.08	1.15	0.52	0.17	0.21	0.07	0.19	0.17	0.17	3.81	1.27
NUEVO	20.47	<b>50.90</b>	<b>2.54</b>	0.64	0.28	<b>0.26</b>	0.25	<b>0.28</b>	<b>0.28</b>	0.30	<b>6.55</b>	<b>2.23</b>

Tabla 28. Estudio comparativo de un análisis de sangre utilizando el patrón rutinario (CIL) y el patrón de acilcarnitinas de CIL reconstituido con la disolución “compuesta”. Valor medio obtenido para las 12 muestras.

Los valores marcados en negrita serían patológicos con los valores de referencia tomados habitualmente. Se observa que claramente afectan a los valores reales de concentración. Asimismo, hay un ruido de fondo considerable.

### 4.4.4. Conclusiones

Se decide tras los resultados obtenidos, realizar un estudio de los patrones por separado, ya que los resultados obtenidos no son concluyentes. Hay una gran variabilidad en los datos de cribado en lo que se cierne a C0, C2, C3, C14 y C16.

## 4.5. Estudio de las disoluciones de los patrones individuales

Debido a la gran cantidad de interferencias que genera el patrón “compuesto” complementario, se decide estudiar uno a uno los patrones para establecer lo que aportan individualmente.

### 4.5.1. Preparación

Para el estudio de los patrones de acilcarnitinas tomados individualmente, se preparan disoluciones de concentraciones análogas a las de trabajo a partir de cada una de las disoluciones de 7.6  $\mu\text{M}$ , tanto para los patrones individuales como el patrón “compuesto” de acilcarnitinas, además del set B reconstituido. Se preparan realizando diluciones 1:200 hasta la obtención de un volumen final de 10 mL (50  $\mu\text{L}$  de cada disolución), obteniéndose, así, las siguientes disoluciones:



## ***Parte experimental***

- Disoluciones individuales C6, C10, C12 y C18, las cuales denominaremos St C6, St C10, St C12 y St C18.
- Disolución patrón “compuesto” de C6, C10, C12 y C18, llamado St compuesto.
- Disolución set B CIL reconstituido con St “compuesto” (St compuesto+set B CIL).
- Disolución patrones individuales mezclados (St suma).
- Disolución patrones individuales mezclados y set B CIL (St suma+set B CIL).
- Disolución trabajo rutinario, set B (St CIL).

### **4.5.2. Pruebas realizadas**

Se realizan varias experiencias para conocer cuál es el estándar que contiene un mayor número de impurezas. En cada pocillo de microtitulación, se deposita por duplicado, 100  $\mu$ L de cada una de las disoluciones anteriores, sobre papel S&S 2992 sin impregnar, de modo que se establece un equilibrio de adsorción sobre el mismo, habiendo cierta analogía con el análisis sobre papel impregnado de sangre.

### **4.5.3. Resultados**

Al igual que en el caso anterior, tras obtener los resultados, se calcula la relación de intensidad de señal de acilcarnitina deuterada en las disoluciones problema objeto de estudio frente a la correspondiente señal de la acilcarnitina deuterada del CIL, y en el caso de las acilcarnitinas no deuteradas, frente a la señal de su correspondiente no deuterada del CIL. Se utiliza para ello las fórmulas que se expusieron en el apartado anterior realizando las mismas consideraciones. Los resultados se indican en las Tabla 29 y Tabla 30 que siguen a continuación.

*Parte experimental*

<b>Acilcarnitina</b>	<b>St C6 (%)</b>	<b>St C10 (%)</b>	<b>St C12 (%)</b>	<b>St C18 (%)</b>
<b>DC0</b>	0.40	0.69	0.63	0.70
<b>C0</b>	<b>111</b>	<b>130</b>	<b>136</b>	<b>139</b>
<b>DC2</b>	<b>4.1</b>	<b>3.8</b>	<b>4.2</b>	<b>4.7</b>
<b>C2</b>	<b>118</b>	<b>112</b>	108	100
<b>DC3</b>	<b>3.6</b>	<b>4.4</b>	<b>3.8</b>	<b>4.8</b>
<b>C3</b>	46	77	82	88
<b>DC4</b>	<b>2.7</b>	<b>3.2</b>	<b>3.7</b>	<b>3.7</b>
<b>C4</b>	67	88	87	103
<b>DC5</b>	<b>3.2</b>	<b>3.6</b>	<b>4.5</b>	<b>4.4</b>
<b>C5</b>	57	71	77	85
<b>C6</b>	54	73	72	<b>119</b>
<b>DC8</b>	1.6	<b>2.6</b>	2.0	<b>2.5</b>
<b>C8</b>	55	78	87	90
<b>C10</b>	94	<b>152</b>	<b>115</b>	<b>122</b>
<b>C12</b>	86	97	78	86
<b>DC14</b>	1.2	1.0	<b>2.9</b>	1.2
<b>C14</b>	48	76	84	91
<b>DC16</b>	0.45	0.55	0.21	0.46
<b>C16</b>	<b>187</b>	<b>221</b>	<b>141</b>	<b>276</b>
<b>C18</b>	104	<b>176</b>	<b>113</b>	<b>166</b>

**Tabla 29. Porcentajes relativos de acilcarnitinas de las disoluciones individuales de los patrones objeto de estudio a las respectivas acilcarnitinas del CIL.**

*Parte experimental*

Acilcarnitina	St compuesto	St suma	St comp.+setB	St suma+stB
<b>DC0</b>	0.79	0.89	101	<b>171</b>
<b>C0</b>	<b>258</b>	<b>304</b>	<b>377</b>	<b>316</b>
<b>DC2</b>	4.5	7.2	80	<b>148</b>
<b>C2</b>	110	95	<b>113</b>	<b>125</b>
<b>DC3</b>	5.1	8.6	96	<b>170</b>
<b>C3</b>	84	<b>115</b>	98	81
<b>DC4</b>	2.4	5.4	96	<b>159</b>
<b>C4</b>	107	<b>116</b>	<b>116</b>	<b>137</b>
<b>DC5</b>	3.4	5.0	104	<b>169</b>
<b>C5</b>	93	<b>132</b>	<b>112</b>	<b>126</b>
<b>C6</b>	95	90	94	78
<b>DC8</b>	2.2	7.3	106	<b>175</b>
<b>C8</b>	<b>123</b>	100	100	95
<b>C10</b>	<b>120</b>	<b>163</b>	150	193
<b>C12</b>	104	97	94	91
<b>DC14</b>	1.2	2.3	84	<b>169</b>
<b>C14</b>	90	73	60	58
<b>DC16</b>	0.47	0.85	77	<b>160</b>
<b>C16</b>	<b>281</b>	<b>182</b>	<b>155</b>	<b>155</b>
<b>C18</b>	<b>108</b>	<b>155</b>	<b>155</b>	<b>119</b>

**Tabla 30. Porcentajes relativos de acilcarnitinas de estandar compuesto, estándar suma, estándar compuesto+set B CIL y estándar suma+set B CIL. Referidos al estándar CIL.**

De la comparación de los resultados del estándar compuesto+set B CIL con el estándar suma+set B CIL, se llega a las mismas conclusiones. En general, se produce un aumento de señal considerable en C0, C2, C10, C18, C16:1, y otras de cadena larga.

Para conocer cuál es la acilcarnitina que más aumenta la señal de fondo se compara:

## *Parte experimental*

1. El estándar compuesto+set B CIL con el estándar de trabajo rutinario, determinando de este modo cuáles son las acilcarnitinas que están más afectadas por un incremento de la señal de fondo.

2. Considerar cual de los cuatro estándares es el causante del aumento de esa señal.

1. Según el estándar compuesto+set B CIL, nos encontramos que afecta a las señales de:

Señal deuterada	Señal no deuterada
(Sin cambios)	C0 377% $\Delta$ Señal 277%
	C10 150% $\Delta$ Señal 50%
	C16 155% $\Delta$ Señal 55%
	C12DC 362% $\Delta$ Señal 262%
	C14:1 123% $\Delta$ Señal 23%
	C16:1 185% $\Delta$ Señal 85%

2. Analizando los resultados de los patrones individuales

Estándar C6:

Señal deuterada	Señal no deuterada
C2 4.1%	C0 111% $\Delta$ Señal 11%
C3 3.6%	C2 118% $\Delta$ Señal 18%
C4 2.7	C16 186% $\Delta$ Señal 86%
C5 4.3%	C16:1 135% $\Delta$ Señal 35%
C10 2.2%	

Estándar C10:

Señal deuterada	Señal no deuterada
C2 3.8%	C0 129% $\Delta$ Señal 29%
C3 4.4%	C2 112% $\Delta$ Señal 12%
C4 3.2%	C10 152% $\Delta$ Señal 52%
C5 3.6%	C16 221% $\Delta$ Señal 121%
C8 2.6%	C18 176% $\Delta$ Señal 76%
	C14:1 121% $\Delta$ Señal 21%

## *Parte experimental*

### Estándar C12:

Señal deuterada		Señal no deuterada	
C2	4.2%	C0	136% $\Delta$ Señal 36%
C3	3.8%	C10	114% $\Delta$ Señal 14%
C4	3.7%	C16	140% $\Delta$ Señal 40%
C5	4.5%	C18	113% $\Delta$ Señal 13%
		C14:1	134% $\Delta$ Señal 34%

### Estándar C18

Señal deuterada		Señal no deuterada	
C2	4.7%	C0	139% $\Delta$ Señal 39%
C3	4.8%	C6	119% $\Delta$ Señal 19%
C4	3.7%	C10	121% $\Delta$ Señal 21%
C5	4.3%	C16	276% $\Delta$ Señal 76%
		C18	165% $\Delta$ Señal 65%
		C12DC	361% $\Delta$ Señal 261%
		C14:1	128% $\Delta$ Señal 28%

Cuando analizamos los resultados de la disolución compuesta de patrones de acilcarnitinas con el patrón de CIL, observamos que se produce un aumento de la señal para las acilcarnitinas no deuteradas, principalmente de C0 y C16:1. Es lógico que las señales de las acilcarnitinas no deuteradas aumente ya que estamos ante valores bajos de señal y un pequeño incremento de la misma afecta al resultado considerablemente. Por ello, analizamos los datos obtenidos para los patrones individuales para conocer cuál es el patrón de acilcarnitinas que más ruido de fondo provoca.

Según los datos, los estándares que en menor proporción aumentan la señal, tanto de acilcarnitinas deuteradas como no deuteradas, son el St C6 y St C12. En el caso del estándar C6, aumenta la señal de C16 y C16:1 dentro de las no deuteradas, mientras que dentro de las deuteradas afecta a C2, C3 y C5, aunque la señal de fondo que producen es del orden de L 4% de la señal del deuterado. El estándar C12, aumenta C0, C16, C14:1, y dentro de las deuteradas, C2, C3, C4 y C5.

## ***Parte experimental***

Respecto a los otros dos estándares, aumentan mucho algunas señales, como es el caso de C16 en el estándar C10, aumentando el doble, y de C0 y C16 en el estándar C18.

### **4.5.4. Resumen del experimento de introducción de IS nuevos**

Los patrones que podrían ser introducidos como complementarios al CIL, son el St C6 y St C12. El St C10 y St C18 incrementan en gran medida algunas de las acilcarnitinas libres como C16. Por lo tanto, se procederá al estudio de la capacidad de cada patrón para cuantificar las respectivas acilcarnitinas.

### **4.6. Evaluación de las sangres del programa de control de calidad externo del CDC con la disolución objeto de estudio**

Una vez realizado el estudio de pureza de los patrones, las interferencias que crean en la señal y quienes son los principales causantes de las mismas, se decide realizar la evaluación de cinco muestras de sangre del programa de control externo de CDC. Esas 5 muestras de sangre están enriquecidas con una o más de las siguientes acilcarnitinas: propionilcarnitina, butirilcarnitina, hexanoilcarnitina, octanoilcarnitina, decanoilcarnitina, miristoilcarnitina y palmitoilcarnitina.

Por ello, sólo puede ser evaluada la capacidad de cuantificación de C6 y C10 de los patrones nuevos.

#### **4.6.1. Preparación**

Se prepara, a partir de las disoluciones individuales de 7.6  $\mu\text{M}$  de C6 y C10, las disoluciones trabajo de 0.04  $\mu\text{M}$  (diluir 1:200 en metanol). Por otra parte, se prepara la disolución trabajo de 0.04  $\mu\text{M}$ , a partir de la disolución compuesta de las 4 acilcarnitinas de 7.6  $\mu\text{M}$ , y del set B de CIL reconstituido con la misma.

#### **4.6.2. Pruebas realizadas**

Se realizan las siguientes experiencias sobre 5 muestras distintas de CDC:

- 100  $\mu\text{L}$  de St C6 individual en los 5 controles, por duplicado.

### *Parte experimental*

- 100 µL de St C10 individual en los 5 controles, por duplicado.
- 100 µL de St compuesto en los 5 controles, una vez.
- 100 µL de St CIL reconstituido con St compuesto por duplicado en CDC.

De este modo, evaluamos los resultados de cuantificación obtenidos con los nuevos patrones, además de su influencia en las señales de otras acilcarnitinas.

#### **4.6.3. Resultados**

A continuación, presentamos las tablas con los resultados obtenidos con cada una de las experiencias realizadas. En la tabla que sigue, nos encontramos con los valores añadidos de acilcarnitinas, además de los valores evaluados estadísticamente por el programa de control de calidad, con su rango para el 95%.

	<b>CDC 1</b>	<b>CDC 2</b>	<b>CDC 3</b>	<b>CDC 4</b>	<b>CDC 5</b>
<b>C3</b>	13.41±4.80	1.80±0.66	1.79±0.91	18.32±6.34	2.72±1.11
<b>C4</b>	2.97±1.65	0.55±0.60	0.25±0.20	5.07±2.37	0.35±0.24
<b>C6</b>	0.08±0.10	1.86±0.74	0.36±0.21	0.09±0.09	0.06±0.07
<b>C8</b>	7.08±2.40	11.77±4.54	0.67±0.34	10.15±3.67	0.12±0.11
<b>C10</b>	0.22±0.16	1.23±0.55	0.67±0.32	0.31±0.21	0.09±0.07
<b>C14</b>	3.06±2.68	0.11±0.11	0.10±0.09	4.35±1.76	0.17±0.13
<b>C16</b>	11.63±3.83	0.86±0.38	0.78±0.29	15.55±4.77	1.34±0.66

**Tabla 31: Valores de acilcarnitinas según programa de control de calidad del CDC, calculados para el 95 % de confianza, en µmol/L de sangre.**

	<b>CDC 1</b>	<b>CDC 2</b>	<b>CDC 3</b>	<b>CDC 4</b>	<b>CDC 5</b>
<b>C6*</b>	<b>41.25</b>	<b>29.00</b>	<b>19.40</b>	<b>14.40</b>	<b>50.00</b>
<b>C10*</b>	<b>5.00</b>	<b>23.00</b>	<b>33.00</b>	<b>9.70</b>	<b>8.90</b>
<b>C6**</b>	<b>46.25</b>	<b>26.34</b>	<b>11.11</b>	<b>43.33</b>	<b>33.33</b>
<b>C10**</b>	<b>27.27</b>	<b>11.38</b>	<b>12.00</b>	<b>0.00</b>	<b>11.11</b>

**Tabla 32. Errores relativos (%) de C6 y C10 evaluadas según los St individuales\* y el compuesto\*\*.**

### *Parte experimental*

	CDC 1	CDC 2	CDC 3	CDC 4	CDC 5
C3	34.67	58.33	37.85	41.38	72.06
C4	11.78	37.50	24.00	26.82	37.14
C6 DC6	52.50	19.98	16.67	10.00	36.67
C6 DC8	43.75	53.23	44.44	66.67	13.33
C8	14.41	42.48	64.18	27.73	58.33
C10 DC10	9.09	18.20	83.58	3.23	77.78
C10 DC8	114	58.85	71.64	91.61	278
C14	24.84	19.91	10.00	0.31	17.64
C16	53.91	48.84	69.23	35.24	85.82

**Tabla 33. Errores relativos para cada una de las acilcarnitinas de los CDC utilizando como patrón el St set B de CIL reconstituido con el St compuesto.**

En el caso del St C6, la predicción no es extremadamente buena, los porcentajes de error relativo son, en general, altos. Aún así, todos los valores entran dentro del rango establecido.

El St C10 presenta errores relativos menores, ajustándose más al valor estadístico. Esta situación se vuelve a comprobar en el estándar compuesto, donde el C6 presenta un mayor error relativo frente a C10.

Por último, cuando analizamos los resultados del estándar de acilcarnitinas CIL reconstituido con la disolución del estándar compuesto, se observa un error relativo de C3, C8 y C16 elevado, en algunos casos superando el rango. Para C4 y C14, el error relativo se mantiene en un 25% aproximadamente, siendo mucho mejor para el C14. En el caso del C6 y C10, hemos obtenido las concentraciones frente D3-C6 y D3-C10 y frente a D3-C8 del CIL. Como conclusión general, vemos que el estándar nuevo proporciona un menor error cuando las concentraciones son elevadas (lógicamente, ya que a mayor concentración más nos alejamos de los LOQ). Cuando son bajas, mejor representatividad la presenta el CIL. La mejor predicción se observa en C10 frente C6.



#### **4.7. Resumen del experimento de introducción de IS nuevos, con sangres control**

El estándar compuesto claramente altera los resultados de las restantes acilcarnitinas, incrementándolas en todos los casos. Por lo cual, introducirlo como complementario del CIL no es aconsejable.

Con respecto a la capacidad de cuantificación, es buena para C10 aunque afectando a los resultados de C16, y aceptable para C6.

#### **4.8. Conclusión de este apartado experimental**

Podemos concluir que la introducción de los nuevos patrones de acilcarnitinas no es viable, ya que afectan en gran medida al ruido de fondo de algunas señales, principalmente las correspondientes a acilcarnitinas de cadena larga. En la última experiencia, al realizar un estudio comparativo respecto a unos valores dados por el CDC, vemos que alteran la capacidad de cuantificación del patrón de acilcarnitinas de CIL. Como el método está perfectamente estandarizado en lo que concierne al uso de los patrones de CIL y son de gran pureza isotópica, obteniendo unos valores de referencia análogos a otros laboratorios de cribado, se concluye que no es aconsejable la introducción de nuevos patrones de acilcarnitinas. El hecho de que se trate de un método optimizado para ser utilizado en un laboratorio de análisis rutinario y no en un laboratorio de investigación, desaconseja además soluciones parciales.

## **5. Resultados del programa de cribado neonatal**

### **5.1. Población de estudio**

Se incluyeron un total de 112288 muestras de sangre (periodo Julio de 2000 - Diciembre de 2005) impregnada en papel con un tamaño poblacional de 103477 neonatos.

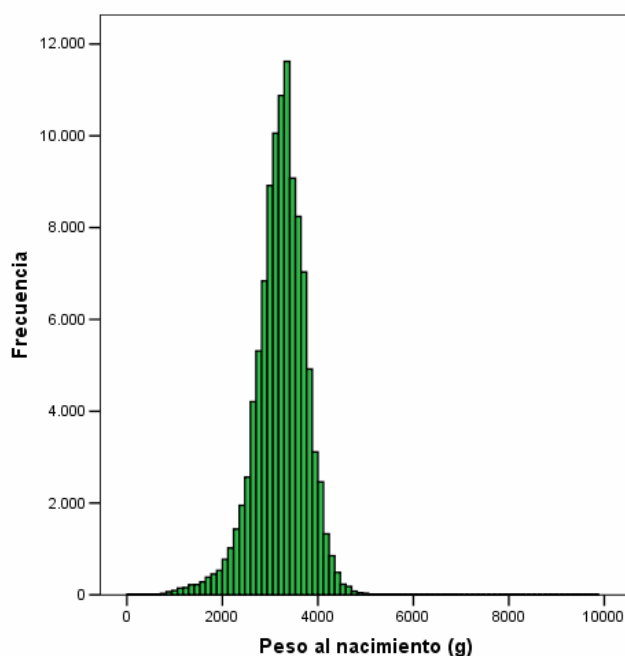
#### **Variables registradas**

En la Tabla 34 se detallan las variables registradas en la base de datos del Programa de Cribado Neonatal.

Algunas de las variables poblacionales de este registro, que se detallan a continuación, permitieron generar valores de corte específicos para diferentes parámetros implicados en el diagnóstico de las metabolopatías encontradas durante el periodo en estudio.

#### **5.1.1. Peso al nacimiento**

Se registró la variable Peso al nacimiento en el 94.7% de los neonatos. El 95% central de esta población, pesó entre 2000 g y 4170 g al nacer, con una mediana de 3250 g. La distribución de estos pesos demostró asimetría negativa (sesgo a la izquierda) (Figura 41).



**Figura 41. Distribución de pesos al nacimiento de la población estudiada**

*Parte experimental*

Variables analíticas			Variables Poblacionales
Acilcarnitinas		Ratios AC y IS	
Carnitina	c16_1	d9_c1	Fecha análisis
Acetilcarnitina	c16_1_oh	d3c_16	Identificador de muestra
Propionilcarnitina	c16_oh	c1	Tipo de papel
Butirilcarnitina	c18_2	c2	Fecha de nacimiento
Octanoilcarnitina	c18_1	c3	Nombre completo
Isovalerilcarnitina	estearoilcarnitina	d9_c14	Sexo
Miristoilcarnitina	c12_dc	d3_c8	Peso al nacimiento (g)
Acrililcarnitina	c18_2_oh	C8/C2	Fecha de toma de muestra
Tigililcarnitina	c18_1_oh	C6/C2	Edad toma muestra (días)
aOHIsovalerilcarn.	c18_oh	C3/C2	Edad llegada al lab. (días)
aOHHexanoilcarn.	c14_dc	C4/C2	Edad alta muestra (días)
Octenoilcarnitina	c20_oh	C5/C2	Edad estimada TM (días)
Decenoilcarnitina	c16_dc	C10/C2	Edad gestacional
Decanoilcarnitina	Dodecadienoilcarn.	C3/C16	Tipo de alimentación
Metilmalonilcarn.	Malonilcarnitina	Glu/C16	Edad inicio alimen. (h)
Glutarilcarnitina		Glu/C2	Marca leche (alim. artif.)
Dodecenoilcarnitina		C5OH/C6	Nº orden nac. (parto múl.)
Dodecanoilcarnitina		CPTI	Nº muestra paciente
aMetilglutarilcarn.		CPTII	Lugar de nacimiento
c14_2		VLCAD	Vacuna hepB
c14_1		C8/C10	Vacuna antiHepB
c14_1oh			Diagnóstico
c14_oh			Res. asignado a la prueba

**Tabla 34. Principales variables que se registran en el Programa de Cribado neonatal (la nomenclatura responde a los nombres introducidos en SPSS)**

### **5.1.2. Edad gestacional**

En un grupo de 31267 neonatos se registró la edad gestacional en el momento del parto, siendo la mediana de 39 semanas de gestación (95% central de la muestra poblacional entre 34 y 41 semanas gestacionales).

### **5.1.3. Edad estimada a la toma de muestra**

La valoración de los resultados proporcionados por el cribado, depende de forma crucial de la edad del neonato en el momento de la toma de muestra. En aquellos casos en que existía registro de la fecha de la toma de muestra y de la fecha de nacimiento del neonato, se calculó la edad a la toma de muestra (en días). Utilizando los casos que contaban con una fecha conocida de toma de muestra y la fecha de recepción de la muestra en el laboratorio, se estimó que el tiempo medio que tardan las muestras en llegar al laboratorio es de 4 días. De este modo se creó la variable “Edad estimada a la toma de muestra”, que tomaba el valor de la variable “Edad a la toma de muestra” en aquellos casos en que ésta era conocida. Dado que la fecha de nacimiento es un campo obligatorio en la base de datos demográficos, en los 4313 casos (3.84%) en que no se registró la fecha de la toma de muestra, se estimó la edad de muestreo restando 4 días a la edad del neonato en el momento de la recepción de la muestra al laboratorio, calculada a partir de la fecha de nacimiento.

De este modo, se evaluaron los resultados en función de la edad estimada a la toma de muestra y se establecieron grupos diferentes de edad (en días) para calcular los parámetros descriptivos de cada parámetro del cribado. Como se aprecia en la Tabla 35, el 82.6% de los neonatos participó en el programa de cribado durante la primera semana de vida (de hecho un 75% realizaron el análisis antes del 7º día de vida) y el 97.4% lo efectuaron a lo largo del primer mes. Las muestras provenientes de solicitudes de repetición, no asociadas a sospecha patológica, fueron consideradas como independientes a efectos de los grupos de edad y el consiguiente cálculo de valores de referencia y constituyen la parte mayoritaria de los grupos de más de un mes

## Parte experimental

	Frecuencia	Porcentaje
< 8 días	92774	82,6
8 - 14 días	11407	10,2
15 - 21 días	3964	3,5
22 - 30 días	1248	1,1
2 - 3 meses	2074	1,8
3 - 6 meses	324	,3
6 - 12 meses	168	,1
> 1 año	329	,3
Total	112288	100

**Tabla 35. Distribución de frecuencias de la edad en el momento de la toma de muestra**

La distribución de los casos estudiados en la primera semana de vida se resume en la Tabla 36. Como se puede observar, casi el 70% de los neonatos fueron estudiados entre el segundo y el quinto día de vida.

EdadTM (d)	n	Porcentaje
0	395	0,4
1	470	0,5
2	4581	4,9
3	22433	24,2
4	17209	18,5
5	20154	21,7
6	16731	18,0
7	10801	11,6
Total	92774	100

**Tabla 36. Distribución de frecuencias de la edad en el momento de la toma de muestra (EdadTM, en días) de los neonatos estudiados en la primera semana de vida**

En algunos casos se observó una demora considerable entre el registro en el sistema informático del laboratorio y la toma de muestra (superior a 15 días). Dada la posible degradación de las carnitinas de cadena corta en estos casos, se calcularon en las 5764 muestras con estas características los valores de C0, C2, C3 y C4 separadamente del resto de la población neonatal normal (Tabla 37).

POBLACION NORMAL (< 8d) Demora registro _ TM												
Percentiles												
Analito	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C0	5,89	8,21	9,74	17,60	31,23	37,14	52,28	62,16	76,97	98,14	354,21	5764
C2	6,12	8,62	10,10	17,07	30,20	35,56	47,68	54,58	63,83	70,33	76,26	5764
C3	0,33	0,45	0,56	1,13	2,33	2,94	4,14	4,74	6,87	8,76	10,00	5764
C4	0,10	0,14	0,16	0,28	0,46	0,54	0,73	0,84	1,05	1,21	1,55	5764

**Tabla 37. Resultados observados para las carnitinas de cadena corta en las muestras de neonatos normales que se registraron en el sistema informático con una demora de al menos 15 días**

#### **5.1.4. Tipo de alimentación**

Dada la repercusión que tiene la alimentación que recibe el neonato en el momento del análisis sobre los niveles de diversas acilcarnitinas, el tipo de alimentación fue considerado como otra variable de gran interés. Por ello se analizaron por separado 103868 muestras en que se conocía el tipo de alimentación (materna, artificial o mixta) con la intención de valorar los posibles cambios que habría que introducir en los valores de referencia de algunos metabolitos e incluso considerar la posibilidad de aplicar diferentes puntos de corte en función de esta variable si fuera oportuno.

Tipo de alimentación		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	Materna	59017	56,8
	Artificial	29959	28,8
	Mixta	14892	14,3
	Total	103868	100,0
Perdidos		1	
	No consta	8419	
	Total	8420	
Total		112288	

**Tabla 38. Tipo de alimentación recibida por la población de estudio**

#### **5.1.5. Sexo**

La distribución de la población neonatal normal estudiada en la primera semana de vida correspondió a un 48.6 % de mujeres y un 51.3% de varones. En el 0.1% de los casos el sexo no estaba registrado y no fue posible deducirlo del nombre del neonato.

## **5.2. Niveles de AC, marcadores de ECM asociados a OA y FAO, en la población estudiada**

Se han medido perfiles que incluyen un elevado número de AC en un total de más de 112000 muestras de sangre impregnada en papel. De estos perfiles se han seleccionado los resultados de de las 30 AC que se han considerado de mayor interés tanto desde el punto de vista del diagnóstico poblacional de los ECM como del conocimiento actual de la implicaciones de las AC.

Para la primera aproximación fue necesario establecer aquellos grupos de edad a la toma de muestra que se consideraron idóneos.

Puesto que la recomendación actual es tomar la sangre de los recién nacidos al tercer día de vida y hasta el año 2004 se recomendaba hacerlo entre el 5º y el 8º día, se ha considerado que el grupo de muestras mayoritarias deben proceder de esta etapa hasta los 8 días de vida, que se corresponde con el grupo de mayor interés cara al posible cribado neonatal, y se ha hecho a esta edad el primer corte. A partir de ahí se ha hecho una distribución por semanas hasta el primer mes de vida, otro grupo de 2-3 meses, otro de más de 3 y hasta seis meses, otro de seis meses a un año y finalmente de más de un año. En estos grupos se han incluido las muestras de repetición y las solicitudes de estudio metabólico que resultaron ser normales. Esta distribución fue teórica en un inicio, decidiendo a posteriori y en función del análisis estadístico la posible agrupación en otros grupos más consistentes si no se observaban diferencias significativas.

Una vez establecidos los grupos de edad, se fueron introduciendo como variables sucesivas el peso al nacimiento, la alimentación y la edad gestacional con el fin de realizar las comparaciones correspondientes en función de todas estas variables.

La base de datos global de trabajo se elaboró a partir de sucesivas bases anuales. A su vez estas salen de la fusión de las hojas excel, filtradas de acuerdo con criterios de calidad analítica consistentes en la eliminación de muestras con bajas “cps” de los IS, resumen de todo el año, y los datos poblacionales disponibles de todos los niños. Se chequean duplicidades así como posibles asignaciones erróneas de información tanto en la fase de registro como en la de análisis. En concreto, fue necesario filtrar tanto edades de los niños como de las muestras, los pesos al nacer y las edades gestacionales erróneas.

## ***Parte experimental***

Se consideró como población normal toda la población menos los sujetos patológicos, ya fueran diagnosticados previamente o por medio del presente estudio. De igual manera se chequeó la posible inclusión errónea de muestras obtenidas en “situaciones críticas” como unidades de cuidados intensivos, post transfusiones, situaciones de crisis metabólica o post-mortem.

Otros factores conocidos que pueden afectar a los niveles de AC, como la terapia antibiótica, las situaciones de hemólisis derivadas de conflictos de RH u otras causas o la alimentación con leches suplementadas en carnitina, fueron imposibles de obviar y se tratará de analizar su influencia en la discusión de los resultados.

El estudio estadístico se realizó con el paquete SPSS V.13 y se ha optado por elaborar tablas que aporten la mayor información posible acerca de la distribución de los valores de las AC en cada grupo.

### **5.3. Resultados de AC en sangre en la primera semana de vida**

Dentro de este grupo de <8d se encuentran la mayor parte de las muestras analizadas, más de 92000, y pese a que se trata de un grupo que así considerado debe ser tenido por heterogéneo responde a la realidad del conjunto de muestras de RN que deben ser analizadas diariamente al ser imposible establecer grupos más homogéneos en el momento del análisis.

De este modo, los percentiles que se deducen de este grupo se corresponden con los puntos de corte utilizados habitualmente a la hora de clasificar los resultados como normales, los que necesitan confirmación o reanálisis, y los claramente sospechosos de patología de acuerdo con los criterios establecidos en el apartado anterior (resultados superiores a los percentiles 99, 99.5 o 99.9).

De acuerdo con esto, en las tablas siguientes (Tabla 39 a y b) se recogen las distribuciones de los niveles de las diferentes AC en sangre de talón impregnada en papel que describen la población neonatal normal sometida a cribado en la primera semana de vida.

Se trata de una serie de AC que, complementadas con las relaciones que se puedan establecer entre ellas con el fin de potenciar su sensibilidad, recogen todos aquellos marcadores necesarios para el diagnóstico precoz de problemas en el metabolismo de AO y FAO en esta etapa de la vida con alta eficacia.



*Parte experimental*

POBLACION NORMAL (< 8d)												
Percentiles												
Analito	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C0	6,77	9,00	10,53	18,36	31,68	36,90	48,77	54,51	70,14	77,89	100,99	92710
C2	7,87	10,06	11,48	18,63	30,81	35,43	45,97	50,90	63,58	70,04	84,55	92709
C3	0,36	0,52	0,64	1,34	2,57	3,06	4,21	4,71	6,03	6,84	8,94	92710
C4	0,09	0,13	0,16	0,27	0,45	0,52	0,68	0,75	0,95	1,07	1,46	92710
C4OH	0,05	0,07	0,08	0,15	0,30	0,36	0,52	0,60	0,89	1,22	3,54	92765
C5	0,05	0,07	0,08	0,14	0,27	0,41	0,82	0,96	1,32	1,50	2,07	92710
C5:1	0,01	0,01	0,01	0,04	0,09	0,11	0,18	0,22	0,35	0,43	0,67	90813
C5OH	0,06	0,08	0,09	0,13	0,20	0,23	0,31	0,35	0,50	0,59	0,93	92711
C6	0,02	0,04	0,05	0,09	0,17	0,21	0,29	0,32	0,40	0,43	0,62	92566
C8:1	0,02	0,03	0,04	0,08	0,14	0,16	0,21	0,23	0,29	0,31	0,52	92595
C8	0,02	0,03	0,04	0,07	0,11	0,13	0,17	0,19	0,26	0,30	0,52	92708
C10:1	0,02	0,04	0,04	0,08	0,13	0,15	0,19	0,22	0,28	0,33	0,50	92612
C10	0,03	0,05	0,06	0,10	0,17	0,20	0,29	0,33	0,44	0,50	0,82	92681
C3DC	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,12	0,13	0,18	0,20	0,29	91851
C4DC	0,06	0,09	0,10	0,17	0,28	0,32	0,42	0,46	0,57	0,63	0,88	92710
C5DC	0,01	0,02	0,02	0,04	0,08	0,10	0,15	0,18	0,23	0,25	0,50	92032
C6DC	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13	0,17	0,19	0,30	92534
C12	0,05	0,06	0,07	0,15	0,37	0,48	0,74	0,87	1,26	1,45	1,98	92710
C14:2	0,01	0,01	0,01	0,03	0,05	0,06	0,09	0,11	0,15	0,16	0,24	92394
C14:1	0,03	0,04	0,05	0,09	0,22	0,27	0,40	0,47	0,65	0,76	0,98	92711
C14	0,07	0,09	0,10	0,17	0,31	0,36	0,47	0,52	0,64	0,69	0,85	92710
C16	0,86	1,17	1,36	2,31	3,79	4,31	5,42	5,93	7,14	7,73	8,98	92711
C18:2	0,05	0,08	0,10	0,20	0,36	0,42	0,54	0,60	0,74	0,83	1,07	92695
C18:1	0,63	0,82	0,93	1,41	2,11	2,37	2,94	3,18	3,77	4,06	5,22	92708
C18	0,33	0,43	0,50	0,80	1,24	1,41	1,76	1,91	2,29	2,45	2,98	92708
C14OH	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,14	91414
C16OH	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,07	0,08	0,12	0,14	0,20	92076
C16-1OH	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,15	0,16	0,20	92504
C18-1OH	0,00	0,01	0,01	0,02	0,05	0,05	0,08	0,09	0,13	0,15	0,24	92195
C18-OH	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,06	0,07	0,10	0,12	0,16	90877

**Tabla 39.a Distribución de concentraciones ( $\mu\text{mol/L}$ ) de los principales parámetros implicados en el cribado de metabolopatías en población normal menor de 8 días de vida**

## Parte experimental

	POBLACION NORMAL (< 8d)							
	Percentiles							
Analito	1%	10%	50%	90%	99%	99.5%	99.9%	N
C8/C2	0,001	0,002	0,004	0,006	0,010	0,012	0,016	92707
C3/C2	0,026	0,041	0,070	0,118	0,183	0,203	0,249	92708
C4/C2	0,005	0,008	0,014	0,024	0,037	0,041	0,054	92709
C5/C2	0,002	0,004	0,008	0,017	0,049	0,060	0,099	92708
C3DC/C4OH	0,041	0,108	0,255	0,500	0,875	1,000	1,400	91843
C3/C16	0,184	0,312	0,577	1,029	1,648	1,872	2,501	92710
C4/C3	0,052	0,093	0,206	0,425	0,714	0,806	1,040	90709
C4/C8	1,219	2,182	4,047	7,921	17,164	22,136	38,295	92569
C5/C0	0,002	0,004	0,008	0,017	0,053	0,067	0,102	90709
C5/C3	0,025	0,046	0,107	0,280	0,738	0,957	1,500	92710
C5OH/C8	0,654	1,125	2,000	3,821	8,892	11,939	21,920	92570
C8/C10	0,171	0,375	0,638	1,060	1,854	2,249	3,543	92683
C3DC/C10	0,073	0,182	0,375	0,672	1,233	1,500	2,496	91825
C5DC/C5OH	0,056	0,155	0,333	0,644	1,364	1,667	2,365	92032
C5DC/C8	0,143	0,345	0,667	1,250	2,667	3,333	5,755	91905
C5DC/C16	0,003	0,009	0,019	0,039	0,077	0,094	0,147	92032
C14:1/C12:1	0,986	1,500	2,667	5,034	10,686	13,561	24,192	92596
C14:1/C16	0,014	0,023	0,041	0,085	0,152	0,181	0,269	92711
C16OH/C16	0,002	0,004	0,009	0,017	0,032	0,038	0,057	92076

Tabla 39.b Distribución de concentraciones ( $\mu\text{mol/L}$ ) de los principales parámetros implicados en el cribado de metabopatías en población normal menor de 8 días de vida

### 5.4. Influencia del peso al nacimiento sobre los valores de AC en la primera semana de vida

Puesto que el peso al nacimiento refleja de modo global el desarrollo del recién nacido y las posibles alteraciones que en él se hayan producido, se ha tratado de reflejar estas diferencias estableciendo varios grupos en función del peso al nacimiento.

De modo general, se consideran de bajo peso los niños de menos de 2500g y este ha sido el principal corte establecido. Asimismo, se consideran como de muy bajo peso al nacimiento aquellos de menos de 1500g y de muy alto peso los que superan los 4100g. Tenemos pues ya establecidos los posibles cuatro grupos a diferenciar.

En las tablas siguientes se presentan los resultados en función de que se hayan encontrado diferencias significativas entre los grupos establecidos según las variables peso al nacimiento y edad a la toma de muestra. El análisis estadístico que permitió encontrar si existían dichas diferencias se basó en una comparación paramétrica (ANOVA) y no paramétrica (Kruskal-Wallis) de todos los grupos de peso o edad, y pruebas a posteriori (Bonferroni) en aquellos casos en que se encontraron diferencias significativas, de cara a

## Parte experimental

decidir cuáles de los grupos debían ser considerados aparte. Algunos de los parámetros estudiados no presentaron diferencias en función del peso al nacimiento (Tabla 40).

POBLACION NORMAL (<8d)												
Percentiles												
Analito	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C14OH	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,15	91414
C16OH	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,07	0,09	0,12	0,14	0,20	92076
C18	0,33	0,43	0,50	0,80	1,24	1,41	1,76	1,91	2,29	2,45	2,99	92708
C18:1	0,63	0,82	0,93	1,41	2,11	2,37	2,94	3,18	3,77	4,06	5,22	92706
C18-1OH	0,01	0,01	0,01	0,02	0,05	0,05	0,08	0,09	0,13	0,15	0,25	92195

Tabla 40. Distribución de los marcadores que no presentaron diferencias en función del peso al nacimiento: C14OH, C16OH, C16, C18:1 y C18-1OH (población neonatal menor de 8 días de vida)

En general se han encontrado diferencias. En las siguientes tablas, (Tabla 41 a Tabla 45), se recogen las distribuciones de los percentiles de cada una de las AC que presentaron diferencias estadísticamente significativas según el peso al nacimiento.

POBLACION NORMAL (<8d según peso al nacimiento)													
Percentiles													
Analito	Peso (g)	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C5:1	≤1500	0,01	0,01	0,01	0,04	0,08	0,11	0,18	0,20	0,35	0,54	0,61	4789
	>1500	0,01	0,01	0,01	0,04	0,09	0,11	0,18	0,23	0,35	0,43	0,67	86022

Tabla 41. Distribución del marcador C5:1 (μmol/L), que mostró diferencias estadísticamente significativas según el peso al nacimiento fuera inferior/superior a 1500 g (población neonatal menor de 8 días de vida)

POBLACION NORMAL (<8d según peso al nacimiento)													
Percentiles													
Analito	Peso (g)	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C0	≤2500	7,37	10,04	11,68	20,30	35,42	41,31	56,16	62,07	82,66	87,12	102,88	10547
	>2500	6,70	8,90	10,40	18,14	31,18	36,22	47,85	53,02	67,10	73,35	99,60	82162
C4OH	≤2500	0,05	0,07	0,08	0,15	0,28	0,33	0,48	0,55	0,77	1,04	7,39	10545
	>2500	0,05	0,07	0,08	0,15	0,30	0,36	0,53	0,61	0,91	1,26	3,28	82155
C3DC	≤2500	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,12	0,14	0,20	0,21	0,25	10424
	>2500	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,12	0,13	0,18	0,21	0,29	81425
C4DC	≤2500	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13	0,17	0,19	0,24	10523
	>2500	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13	0,17	0,19	0,36	82009
C5DC	≤2500	0,01	0,02	0,02	0,05	0,09	0,10	0,16	0,19	0,24	0,29	0,72	10481
	>2500	0,01	0,02	0,02	0,04	0,08	0,10	0,15	0,18	0,23	0,25	0,50	81550
C6DC	≤2500	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13	0,17	0,19	0,24	10523
	>2500	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13	0,17	0,19	0,36	82009
C6	≤2500	0,02	0,04	0,05	0,10	0,18	0,21	0,28	0,31	0,40	0,42	0,57	10527
	>2500	0,02	0,04	0,05	0,09	0,18	0,21	0,29	0,32	0,40	0,43	0,64	82038
C8	≤2500	0,02	0,03	0,04	0,07	0,12	0,14	0,18	0,20	0,26	0,30	0,44	10547
	>2500	0,02	0,03	0,04	0,07	0,11	0,13	0,17	0,19	0,26	0,30	0,54	82160
C12	≤2500	0,04	0,06	0,07	0,15	0,38	0,49	0,76	0,87	1,33	1,44	2,97	10547
	>2500	0,05	0,06	0,07	0,15	0,37	0,48	0,74	0,87	1,25	1,46	1,97	82161
C14:1	≤2500	0,03	0,04	0,05	0,10	0,24	0,29	0,42	0,50	0,69	0,84	1,19	10547
	>2500	0,03	0,04	0,05	0,09	0,22	0,27	0,40	0,47	0,65	0,75	0,97	82162
C18-OH	≤2500	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,06	0,07	0,11	0,12	0,14	10303
	>2500	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,06	0,07	0,10	0,12	0,17	80572

Tabla 42. Distribución de los marcadores C0, C4OH, C3DC, C4DC, C5DC, C6DC, C6, C8, C12, C14:1 y C18OH (μmol/L), que mostraron diferencias estadísticamente significativas según el peso al nacimiento fuera inferior/superior a 2500 g (población neonatal menor de 8 días de vida)

## Parte experimental

POBLACION NORMAL (<8d según peso al nacimiento)													
		Percentiles											
Analito	Peso (g)	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C2	≤2500	8,22	10,52	12,18	19,95	33,03	38,27	51,54	58,60	75,15	78,17	97,47	10547
	2501-4100	7,82	9,99	11,40	18,45	30,47	34,92	45,09	49,54	60,95	66,02	80,04	79274
	>4100	8,00	10,06	11,62	18,93	32,00	36,62	48,42	52,05	65,32	76,62	81,77	2886
C3	≤2500	0,39	0,56	0,70	1,44	2,74	3,26	4,47	5,06	7,04	7,79	9,91	10547
	2501-4100	0,36	0,52	0,63	1,32	2,53	3,01	4,15	4,61	5,87	6,56	8,77	79275
	>4100	0,38	0,53	0,65	1,43	2,81	3,41	4,70	5,18	7,00	7,91	7,93	2886
C16	≤2500	0,78	1,13	1,31	2,24	3,69	4,19	5,32	5,90	7,31	7,67	8,38	10547
	2501-4100	0,88	1,18	1,36	2,32	3,80	4,32	5,43	5,93	7,14	7,74	9,04	79276
	>4100	0,94	1,26	1,47	2,46	3,94	4,56	5,65	6,05	7,16	9,66	11,19	2886

Tabla 43. Distribución de los marcadores C2, C3 y C16 (μmol/L), que mostraron diferencias estadísticamente significativas según el peso al nacimiento fuera inferior a 2500 g, entre 2500 y 4100 g o superior a 4100 g (población neonatal menor de 8 días de vida)

POBLACION NORMAL (<8d según peso al nacimiento)													
		Percentiles											
Analito	Peso (g)	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C8:1	≤1500	0,02	0,03	0,04	0,08	0,15	0,17	0,22	0,25	0,32	0,36	0,71	4900
	1501-2500	0,02	0,04	0,05	0,10	0,17	0,19	0,25	0,27	0,32	0,35	0,44	5637
	>2500	0,02	0,03	0,04	0,07	0,13	0,16	0,20	0,23	0,28	0,30	0,52	82056
C5	≤1500	0,05	0,07	0,08	0,15	0,51	0,72	1,09	1,30	1,79	1,91	2,42	4910
	1501-2500	0,06	0,08	0,10	0,18	0,59	0,77	1,13	1,31	1,65	2,12	3,48	5637
	>2500	0,05	0,07	0,08	0,14	0,25	0,35	0,73	0,87	1,19	1,35	1,93	82161

Tabla 44. Distribución de los marcadores C18:1 y C5 (μmol/L), que mostraron diferencias estadísticamente significativas según el peso al nacimiento fuera inferior a 1500 g, entre 1500 y 2500 g o superior a 2500 g (población neonatal menor de 8 días de vida)

## Parte experimental

POBLACION NORMAL (<8d según peso al nacimiento)													
Percentiles													
Analito	Peso (g)	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C4	≤1500	0,12	0,17	0,20	0,33	0,56	0,66	0,96	1,18	1,49			317
	1501-2500	0,10	0,14	0,17	0,28	0,48	0,56	0,74	0,80	0,95	1,10	1,30	5637
	2501-4100	0,09	0,13	0,16	0,27	0,45	0,52	0,68	0,75	0,95	1,07	1,43	79275
	>4100	0,09	0,12	0,15	0,26	0,43	0,50	0,66	0,73	0,89	1,47	1,94	2886
C5OH	≤1500	0,06	0,08	0,10	0,14	0,23	0,26	0,40	0,43	0,45			317
	1501-2500	0,06	0,08	0,09	0,14	0,21	0,24	0,31	0,35	0,48	0,94	4,36	5637
	2501-4100	0,06	0,08	0,09	0,13	0,20	0,23	0,31	0,34	0,51	0,59	0,88	79276
	>4100	0,06	0,08	0,09	0,14	0,21	0,25	0,33	0,37	0,52	0,66	0,70	2886
C10	≤1500	0,03	0,04	0,05	0,10	0,15	0,19	0,27	0,32	0,35			317
	1501-2500	0,03	0,05	0,06	0,10	0,17	0,20	0,28	0,34	0,46	0,60	0,98	5635
	2501-4100	0,03	0,05	0,06	0,10	0,18	0,20	0,29	0,34	0,44	0,51	0,80	79252
	>4100	0,03	0,05	0,06	0,10	0,17	0,19	0,27	0,31	0,39	0,45	0,49	2886
C10:1	≤1500	0,01	0,03	0,03	0,07	0,12	0,15	0,24	0,24	0,24			317
	1501-2500	0,02	0,04	0,05	0,08	0,14	0,16	0,20	0,23	0,27	0,35	0,38	5629
	2501-4100	0,02	0,04	0,04	0,08	0,13	0,15	0,19	0,22	0,28	0,33	0,60	79195
	>4100	0,02	0,03	0,04	0,07	0,12	0,14	0,19	0,21	0,27	0,29	0,31	2882
C14	≤1500	0,05	0,09	0,11	0,20	0,36	0,41	0,55	0,70	0,70			317
	1501-2500	0,06	0,09	0,11	0,18	0,32	0,37	0,50	0,55	0,69	0,88	1,04	5637
	2501-4100	0,07	0,09	0,10	0,18	0,31	0,35	0,47	0,51	0,64	0,69	0,81	79276
	>4100	0,06	0,09	0,10	0,17	0,30	0,35	0,45	0,49	0,59	0,60	0,61	2886
C14:2	≤1500	0,01	0,01	0,02	0,03	0,08	0,10	0,15	0,19				316
	1501-2500	0,01	0,01	0,02	0,03	0,06	0,08	0,11	0,12	0,15	0,18		5615
	2501-4100	0,01	0,01	0,01	0,03	0,05	0,06	0,09	0,11	0,14	0,16	0,24	78828
	>4100	0,01	0,01	0,01	0,02	0,05	0,06	0,08	0,10	0,14	0,17		2872
C16-1OH	≤1500	0,01	0,02	0,02	0,05	0,08	0,09	0,16	0,23				316
	1501-2500	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,11	0,15	0,16		5615
	2501-4100	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,15	0,16	0,20	78828
	>4100	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,10	0,12	0,16	0,16		2872
C18:2	≤1500	0,07	0,10	0,12	0,25	0,53	0,69	1,01	1,08	1,13			317
	1501-2500	0,07	0,11	0,14	0,25	0,45	0,51	0,66	0,72	0,91	0,95	1,24	5637
	2501-4100	0,05	0,08	0,10	0,20	0,35	0,41	0,53	0,58	0,71	0,78	1,03	79261
	>4100	0,05	0,08	0,09	0,18	0,32	0,37	0,48	0,52	0,69	0,73	0,75	2885

Tabla 45. Distribución de los marcadores C4, C5OH, C10, C10:1, C14, C14:2, C16-1OH y C18:2 (μmol/L) que mostraron diferencias estadísticamente significativas según el peso al nacimiento fuera inferior a 1500 g, entre 1500 y 2500 g, entre 2500 y 4100 o superior a 4100 g (población neonatal menor de 8 días de vida)

Le revisión de las tablas anteriores hace pensar que en general hay diferencias importantes en las concentraciones de AC en sangre en cuanto al peso al nacimiento y que los grupos extremos deben ser considerados aparte si se quiere tener un patrón de normalidad de AC que pueda reflejar de forma mas nítida estas variaciones.

#### 5.4.1. Niveles de AC en sangre en la primera semana de vida, en el grupo de RN con pesos entre 1500 y 4100g

De acuerdo con lo observado en el apartado anterior, se han seleccionado los RN comprendidos en este grupo y que sigue siendo el grupo mayoritario de los analizados.

Se trata por tanto de un grupo de resultados que reflejan de forma más homogénea los valores de las AC en los niños sanos en la primera semana de vida.

En la Tabla 46 se presentan los valores de la distribución de percentiles para la población neonatal con peso al nacer entre 1500 y 4100 g, que se desglosan en la Tabla 47. Se agrupan en función de que el peso estuviese entre 1500 y 2500g o entre 2501 y 4100g ya que la mayoría de los RN están englobados en este grupo (79274 de 84911) independientemente de que en el análisis estadístico dichos grupos hubieran demostrado diferencias significativas respecto al resto o no.

POBLACION NORMAL (< 8d, entre 1500 y 4100 g peso al nacimiento)												
Percentiles												
Analito	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C0	6,75	8,96	10,48	18,29	31,55	36,77	48,58	54,23	69,48	76,38	101,66	88116
C2	7,86	10,03	11,46	18,58	30,73	35,34	45,74	50,65	63,28	70,15	85,02	88114
C3	0,36	0,51	0,64	1,33	2,55	3,04	4,20	4,69	6,03	6,83	9,08	88115
C4	0,09	0,13	0,16	0,27	0,45	0,52	0,68	0,75	0,95	1,07	1,47	88115
C4OH	0,05	0,07	0,08	0,15	0,30	0,36	0,52	0,60	0,90	1,23	2,91	88108
C5	0,05	0,07	0,08	0,14	0,26	0,39	0,80	0,95	1,31	1,48	2,11	88115
C5:1	0,01	0,01	0,01	0,04	0,09	0,11	0,18	0,23	0,35	0,43	0,67	86336
C5OH	0,06	0,08	0,09	0,13	0,20	0,23	0,31	0,35	0,50	0,59	0,93	88116
C6	0,02	0,04	0,05	0,09	0,17	0,21	0,29	0,32	0,40	0,43	0,63	87986
C8:1	0,02	0,03	0,04	0,08	0,14	0,16	0,21	0,23	0,28	0,31	0,55	88010
C8	0,02	0,03	0,04	0,07	0,11	0,13	0,17	0,19	0,26	0,30	0,53	88114
C10:1	0,02	0,04	0,04	0,08	0,13	0,15	0,19	0,22	0,28	0,33	0,54	88023
C10	0,03	0,05	0,06	0,10	0,17	0,20	0,29	0,33	0,44	0,50	0,81	88090
C3DC	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,12	0,13	0,18	0,21	0,29	87313
C4DC	0,06	0,09	0,10	0,17	0,28	0,32	0,42	0,46	0,57	0,63	0,87	88115
C5DC	0,01	0,02	0,02	0,04	0,08	0,10	0,16	0,18	0,23	0,25	0,51	87476
C6DC	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13	0,17	0,19	0,32	87948
C12	0,05	0,06	0,07	0,15	0,37	0,48	0,73	0,86	1,25	1,45	1,98	88115
C14:2	0,01	0,01	0,01	0,03	0,05	0,06	0,09	0,11	0,15	0,16	0,24	87818
C14:1	0,03	0,04	0,05	0,09	0,22	0,27	0,40	0,47	0,65	0,76	0,97	88116
C14	0,07	0,09	0,10	0,17	0,31	0,36	0,47	0,51	0,64	0,69	0,82	88116
C16	0,87	1,17	1,36	2,31	3,79	4,30	5,42	5,93	7,16	7,71	9,11	88116
C18:2	0,05	0,08	0,10	0,20	0,36	0,41	0,54	0,60	0,74	0,83	1,09	88100
C18:1	0,63	0,82	0,93	1,41	2,11	2,37	2,94	3,18	3,79	4,07	5,23	88114
C18	0,33	0,43	0,50	0,80	1,24	1,41	1,75	1,91	2,31	2,46	3,00	88113
C14OH	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,15	86889
C16OH	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,07	0,08	0,12	0,14	0,20	87518
C16-1OH	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,15	0,17	0,21	87922
C18-1OH	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,08	0,09	0,13	0,15	0,23	87634
C18-OH	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,06	0,07	0,10	0,12	0,17	86369

Tabla 46. Distribución de percentiles de la población neonatal menor de 8 días de vida, con peso al nacimiento entre 1500 y 4100 g

## Parte experimental

POBLACION NORMAL (<8d según peso al nacimiento)													
Percentiles													
Analito	Peso (g)	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C0	1501-2500	7,50	10,24	11,81	20,63	36,55	42,91	57,72	63,76	85,63	92,04	103,04	5637
	2501-4100	6,70	8,90	10,40	18,12	31,18	36,22	47,84	53,00	67,02	73,17	101,64	79274
C2	1501-2500	8,46	10,63	12,34	20,31	33,48	39,32	52,63	61,91	77,77	86,36	92,19	5637
	2501-4100	7,82	9,99	11,40	18,45	30,47	34,92	45,09	49,54	60,95	66,02	80,04	79274
C3	1501-2500	0,39	0,56	0,69	1,41	2,74	3,26	4,57	5,19	7,53	8,32	9,96	5637
	2501-4100	0,36	0,51	0,63	1,32	2,53	3,01	4,15	4,61	5,87	6,56	8,77	79274
C4	1501-2500	0,10	0,14	0,17	0,28	0,48	0,56	0,74	0,80	0,95	1,10	1,30	5637
	2501-4100	0,09	0,13	0,16	0,27	0,45	0,52	0,68	0,75	0,95	1,07	1,43	79275
C4OH	1501-2500	0,05	0,07	0,08	0,14	0,26	0,31	0,45	0,51	0,79	0,96	1,59	5636
	2501-4100	0,05	0,07	0,08	0,15	0,30	0,36	0,53	0,61	0,92	1,27	3,43	79269
C5	1501-2500	0,06	0,08	0,10	0,17	0,59	0,77	1,13	1,31	1,65	2,12	3,48	5637
	2501-4100	0,05	0,07	0,08	0,14	0,25	0,35	0,72	0,87	1,19	1,34	1,92	79275
C5:1	1501-2500	0,01	0,01	0,02	0,04	0,09	0,12	0,18	0,22	0,30	0,36	0,44	5522
	2501-4100	0,01	0,01	0,02	0,04	0,09	0,12	0,19	0,23	0,36	0,44	0,67	72898
C5OH	1501-2500	0,06	0,08	0,09	0,14	0,21	0,24	0,31	0,35	0,48	0,94	4,36	5637
	2501-4100	0,06	0,08	0,09	0,13	0,20	0,23	0,31	0,34	0,51	0,59	0,88	79276
C6	1501-2500	0,02	0,04	0,05	0,10	0,18	0,22	0,29	0,33	0,40	0,41	0,45	5631
	2501-4100	0,02	0,04	0,05	0,09	0,17	0,21	0,29	0,32	0,40	0,43	0,63	79157
C8:1	1501-2500	0,02	0,04	0,05	0,10	0,17	0,19	0,25	0,27	0,32	0,35	0,44	5637
	2501-4100	0,02	0,03	0,04	0,07	0,13	0,16	0,20	0,23	0,28	0,30	0,46	79069
C8	1501-2500	0,02	0,03	0,04	0,07	0,12	0,14	0,19	0,21	0,27	0,29	0,39	5637
	2501-4100	0,02	0,03	0,04	0,07	0,11	0,13	0,17	0,19	0,26	0,30	0,55	79274
C10:1	1501-2500	0,02	0,04	0,05	0,08	0,14	0,16	0,20	0,23	0,27	0,35	0,38	5629
	2501-4100	0,02	0,04	0,04	0,08	0,13	0,15	0,19	0,22	0,28	0,33	0,60	79195
C10	1501-2500	0,03	0,05	0,06	0,10	0,17	0,20	0,28	0,34	0,46	0,60	0,98	5635
	2501-4100	0,03	0,05	0,06	0,10	0,18	0,20	0,29	0,34	0,44	0,51	0,80	79252
C3DC	1501-2500	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,13	0,14	0,20	0,21	0,25	5576
	2501-4100	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,12	0,13	0,18	0,20	0,29	78573
C4DC	1501-2500	0,05	0,08	0,09	0,16	0,26	0,29	0,39	0,43	0,57	0,64	0,86	5637
	2501-4100	0,06	0,09	0,11	0,17	0,28	0,32	0,42	0,47	0,57	0,64	0,89	78678
C5DC	1501-2500	0,01	0,02	0,02	0,05	0,09	0,11	0,17	0,20	0,25	0,30	0,74	5609
	2501-4100	0,01	0,02	0,02	0,04	0,08	0,10	0,15	0,17	0,23	0,25	0,51	78678
C6DC	1501-2500	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,18	0,20	0,24	5623
	2501-4100	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13	0,17	0,19	0,39	79128
C12	1501-2500	0,04	0,06	0,07	0,15	0,34	0,44	0,69	0,83	1,27	1,44	2,79	5637
	2501-4100	0,05	0,06	0,07	0,15	0,37	0,48	0,73	0,86	1,26	1,46	1,95	78678
C14:2	1501-2500	0,01	0,01	0,02	0,03	0,06	0,08	0,11	0,12	0,15	0,18	0,21	5628
	2501-4100	0,01	0,01	0,01	0,03	0,05	0,06	0,09	0,11	0,14	0,16	0,25	78999
C14:1	1501-2500	0,03	0,04	0,05	0,10	0,23	0,28	0,42	0,51	0,73	0,86	1,19	5637
	2501-4100	0,03	0,04	0,05	0,09	0,22	0,27	0,39	0,46	0,65	0,75	0,96	77697
C14	1501-2500	0,06	0,09	0,11	0,18	0,32	0,37	0,50	0,55	0,69	0,88	1,04	5637
	2501-4100	0,07	0,09	0,10	0,18	0,31	0,35	0,47	0,51	0,64	0,69	0,81	79276
C16	1501-2500	0,77	1,07	1,26	2,16	3,52	4,02	5,20	5,99	7,55	7,62	7,88	5637
	2501-4100	0,88	1,17	1,36	2,32	3,80	4,32	5,43	5,93	7,14	7,74	9,04	79274
C18:2	1501-2500	0,07	0,11	0,14	0,25	0,45	0,51	0,66	0,72	0,91	0,95	1,24	5637
	2501-4100	0,05	0,08	0,10	0,20	0,35	0,41	0,53	0,58	0,71	0,78	1,03	79261
C18:1	1501-2500	0,66	0,87	0,99	1,50	2,28	2,60	3,26	3,54	4,10	4,25	4,62	5637
	2501-4100	0,63	0,82	0,92	1,40	2,10	2,35	2,91	3,14	3,74	4,04	5,20	79274
C18	1501-2500	0,33	0,43	0,50	0,79	1,22	1,37	1,73	1,87	2,47	2,68	3,18	5637
	2501-4100	0,33	0,43	0,50	0,80	1,24	1,41	1,75	1,91	2,29	2,46	2,99	79273
C14OH	1501-2500	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,08	0,09	0,12	0,12	0,13	5546
	2501-4100	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,15	78183
C16OH	1501-2500	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,07	0,09	0,13	0,15	0,16	5579
	2501-4100	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,07	0,08	0,12	0,14	0,21	78753
C16-1OH	1501-2500	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,11	0,15	0,16	0,17	5624
	2501-4100	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,15	0,17	0,20	79099
C18-1OH	1501-2500	0,01	0,01	0,01	0,02	0,05	0,05	0,08	0,10	0,13	0,15	0,25	5601
	2501-4100	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,08	0,09	0,13	0,15	0,23	78849
C18-OH	1501-2500	0,00	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,06	0,07	0,10	0,12	0,14	5493
	2501-4100	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,06	0,07	0,10	0,12	0,17	77746

Tabla 47. Distribución de percentiles de la población neonatal menor de 8 días de vida con peso al nacimiento entre 1500 y 4100 g, en función de dicho peso sea inferior/superior a 2500 g.



### 5.5. Influencia de la alimentación en los niveles de AC en la primera semana de vida

Asimismo, se analizó el efecto del tipo de alimentación sobre los niveles de AC en la población de estudio. A continuación se muestran los valores de los diferentes parámetros en función de los grupos que presentaron diferencias estadísticamente significativas, tanto en la variable peso al nacimiento como en el tipo de alimentación (Tabla 49 a Tabla 53).

Se ha realizado el estudio a partir de los grupos y diferencias observados previamente al considerar solo el peso al nacimiento.

Se constatan diferencias importantes en este apartado, la combinación de variables, hace sin embargo de difícil interpretación estas diferencias y, sobre todo, de difícil traslado a la sistemática diaria de un programa de cribado neonatal salvo que se disponga de una herramienta informática potente de apoyo.

El hecho de que sea esta una información disponible sólo en un 70 a 75 % de los niños, hace que deba ser manejada con prudencia.

POBLACION NORMAL (<8d según alimentación)													
		Percentiles											
Analito	Alimentación	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C14OH	Materna	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,15	49153
	Artificial	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,40	23472
	Mixta	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13	0,14	11850
C16OH	Materna	0,01	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,07	0,09	0,12	0,14	0,20	49153
	Artificial	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13	0,64	23472
	Mixta	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,07	0,09	0,12	0,13	0,19	11850
C18	Materna	0,35	0,46	0,52	0,83	1,28	1,44	1,79	1,93	2,32	2,50	2,96	49153
	Artificial	0,30	0,40	0,46	0,74	1,17	1,33	1,68	1,84	2,15	2,37	3,30	23472
	Mixta	0,34	0,44	0,50	0,80	1,24	1,41	1,75	1,90	2,25	2,39	3,07	11850
C18:1	Materna	0,62	0,81	0,91	1,38	2,05	2,30	2,84	3,04	3,62	3,85	4,71	49153
	Artificial	0,65	0,84	0,96	1,46	2,20	2,49	3,11	3,33	3,97	4,33	6,47	23472
	Mixta	0,67	0,84	0,94	1,44	2,13	2,39	2,96	3,21	3,81	4,21	4,76	11850
C18-10H	Materna	0,01	0,01	0,01	0,02	0,05	0,05	0,08	0,09	0,13	0,15	0,23	49153
	Artificial	0,01	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,08	0,09	0,12	0,14	0,77	23472
	Mixta	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,08	0,10	0,15	0,17	0,28	11850

Tabla 48. Distribución de diversos marcadores ( $\mu\text{mol/L}$ ) que no mostraron diferencias significativas en función del peso al nacimiento en la población neonatal menor de 8 días de vida en función del tipo de alimentación (materna, artificial o mixta).



*Parte experimental*

		POBLACION NORMAL (<8d según peso al nacimiento y alimentación)													
Analito		Peso (g)	Alimentación	Percentiles										N	
				1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%		99.99%
C0	≤2500	Materna		7,04	9,13	10,71	18,42	32,60	38,16	50,02	53,81	69,55	71,76		2211
		Artificial		7,45	9,78	11,74	20,71	35,91	41,70	56,36	63,47	82,96	95,39		3196
		Mixta		7,54	10,43	12,09	20,31	37,26	44,04	58,51	66,82	91,52		1608	
	>2500	Materna		6,62	8,70	10,14	17,62	30,31	35,19	46,40	51,27	65,29	72,81	89,01	47980
		Artificial		7,02	9,39	10,92	18,87	32,49	37,50	49,30	55,43	67,05	72,22	121,76	20999
		Mixta		6,84	9,07	10,67	18,78	31,87	37,46	49,07	55,54	70,81	73,53	134,02	10575
C3DC	≤2500	Materna		0,01	0,02	0,02	0,04	0,08	0,09	0,13	0,14	0,17	0,18		2193
		Artificial		0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,12	0,16	0,23	0,25		3159
		Mixta		0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,09	0,13	0,17	0,20		1591	
	>2500	Materna		0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,12	0,14	0,18	0,21	0,30	47598
		Artificial		0,01	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,11	0,13	0,17	0,20	0,57	20800
		Mixta		0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,14	0,19	0,21	0,30	10446
C4DC	≤2500	Materna		0,05	0,08	0,10	0,17	0,28	0,32	0,42	0,46	0,50	0,51		2211
		Artificial		0,05	0,08	0,09	0,16	0,26	0,30	0,40	0,44	0,57	0,69		3196
		Mixta		0,05	0,08	0,09	0,16	0,26	0,30	0,38	0,43	0,53		1608	
	>2500	Materna		0,06	0,09	0,11	0,17	0,28	0,33	0,42	0,46	0,57	0,63	0,90	47979
		Artificial		0,06	0,09	0,11	0,17	0,28	0,32	0,43	0,47	0,58	0,66	0,82	20999
		Mixta		0,06	0,09	0,10	0,17	0,28	0,32	0,41	0,45	0,55	0,64	1,03	10575
C5DC	≤2500	Materna		0,01	0,19	0,02	0,05	0,09	0,11	0,17	0,19	0,27	0,27		2199
		Artificial		0,01	0,02	0,02	0,05	0,08	0,10	0,17	0,20	0,23	0,26		3182
		Mixta		0,01	0,02	0,02	0,05	0,09	0,10	0,17	0,18	0,21		1597	
	>2500	Materna		0,01	0,02	0,02	0,05	0,08	0,10	0,16	0,17	0,23	0,25	0,52	47679
		Artificial		0,01	0,02	0,02	0,04	0,08	0,09	0,15	0,17	0,23	0,25	0,58	20813
		Mixta		0,01	0,02	0,02	0,04	0,08	0,10	0,15	0,17	0,22	0,23	0,50	10478
C6DC	≤2500	Materna		0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,09	0,12	0,13	0,17	0,18		2209
		Artificial		0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13	0,20	0,22		3188
		Mixta		0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,16		1604	
	>2500	Materna		0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,12	0,13	0,17	0,18	0,51	47908
		Artificial		0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13	0,16	0,20	0,54	20949
		Mixta		0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13	0,17	0,18	0,25	10549
C6	≤2500	Materna		0,02	0,04	0,05	0,10	0,18	0,22	0,28	0,31	0,42	0,45		2208
		Artificial		0,02	0,04	0,05	0,10	0,18	0,22	0,30	0,33	0,40	0,48		3193
		Mixta		0,02	0,04	0,05	0,10	0,18	0,21	0,29	0,33	0,40		1606	
	>2500	Materna		0,02	0,04	0,05	0,09	0,18	0,21	0,29	0,32	0,40	0,43	0,57	47913
		Artificial		0,02	0,04	0,05	0,09	0,17	0,21	0,28	0,31	0,38	0,42	0,80	20964
		Mixta		0,02	0,04	0,05	0,09	0,17	0,21	0,30	0,33	0,39	0,42	0,46	10559
C8	≤2500	Materna		0,02	0,03	0,04	0,07	0,12	0,14	0,18	0,19	0,29	0,38		2211
		Artificial		0,02	0,03	0,04	0,07	0,11	0,13	0,18	0,22	0,28	0,34		3196
		Mixta		0,02	0,03	0,04	0,07	0,12	0,14	0,19	0,22	0,25		1608	
	>2500	Materna		0,02	0,03	0,04	0,07	0,11	0,13	0,18	0,20	0,26	0,29	0,46	47979
		Artificial		0,01	0,03	0,04	0,06	0,10	0,12	0,16	0,18	0,23	0,28	0,62	20999
		Mixta		0,02	0,03	0,04	0,07	0,11	0,13	0,17	0,19	0,28	0,34	0,46	10574
C12	≤2500	Materna		0,05	0,06	0,07	0,15	0,38	0,51	0,81	0,92	1,32	2,63		2211
		Artificial		0,04	0,06	0,07	0,13	0,30	0,37	0,57	0,70	1,04	1,40		3196
		Mixta		0,05	0,06	0,07	0,15	0,36	0,45	0,68	0,81	1,33		1608	
	>2500	Materna		0,05	0,06	0,07	0,15	0,39	0,50	0,77	0,90	1,26	1,52	1,98	47979
		Artificial		0,05	0,06	0,07	0,13	0,31	0,40	0,63	0,74	1,07	1,30	1,92	20999
		Mixta		0,05	0,06	0,08	0,16	0,40	0,51	0,74	0,91	1,44	1,63	2,02	10575
C14:1	≤2500	Materna		0,03	0,04	0,05	0,10	0,23	0,29	0,44	0,49	0,86	1,16		2211
		Artificial		0,03	0,04	0,05	0,09	0,21	0,26	0,38	0,42	0,65	0,87		3196
		Mixta		0,03	0,04	0,05	0,10	0,23	0,28	0,41	0,53	0,62		1608	
	>2500	Materna		0,03	0,04	0,05	0,09	0,22	0,27	0,40	0,47	0,64	0,74	0,96	47980
		Artificial		0,03	0,04	0,04	0,09	0,20	0,25	0,37	0,44	0,65	0,74	0,97	20999
		Mixta		0,03	0,04	0,05	0,10	0,23	0,28	0,42	0,48	0,76	0,94	1,12	10575
C18-OH	≤2500	Materna		0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,06	0,07	0,09	0,09	0,10	2174
		Artificial		0,00	0,00	0,01	0,01	0,03	0,04	0,06	0,08	0,12	0,13	0,13	3125
		Mixta		0,00	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,07	0,08	0,11	0,11		1560
	>2500	Materna		0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,06	0,07	0,10	0,11	0,16	47193
		Artificial		0,00	0,00	0,01	0,01	0,03	0,04	0,06	0,07	0,10	0,12	1,01	20486
		Mixta		0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,06	0,07	0,10	0,12	0,21	10345
C4OH	≤2500	Materna		0,05	0,07	0,08	0,15	0,31	0,38	0,53	0,62	0,86	6,80		2211
		Artificial		0,05	0,07	0,08	0,13	0,23	0,28	0,39	0,44	0,84	1,46		3195
		Mixta		0,04	0,07	0,08	0,15	0,27	0,32	0,43	0,48	0,58		1608	
	>2500	Materna		0,05	0,07	0,09	0,16	0,32	0,39	0,55	0,63	0,90	1,28	3,46	20996
		Artificial		0,04	0,06	0,07	0,13	0,23	0,28	0,42	0,51	0,98	1,25	2,37	47978
		Mixta		0,05	0,07	0,08	0,15	0,29	0,36	0,51	0,60	0,87	1,29	3,48	10573

Tabla 49. Distribución de diversos marcadores (μmol/L) en la población neonatal menor de 8 días de vida en función del peso al nacimiento (inferior/superior a 2500g) y el tipo de alimentación (materna, artificial o mixta).

## Parte experimental

		POBLACION NORMAL (<8d según peso al nacimiento y alimentaión)												
				Percentiles										
Analito	Peso (g)	Alimentacion	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C5:1	≤1500	Materna	0,01	0,01	0,02	0,04	0,10	0,12	0,19	0,22				980
		Artificial	0,01	0,01	0,02	0,04	0,09	0,12	0,21	0,27				797
		Mixta	0,00	0,01	0,02	0,04	0,09	0,13	0,26	0,27				296
	>1500	Materna	0,01	0,01	0,01	0,04	0,09	0,11	0,19	0,23	0,37	0,45	0,68	48219
		Artificial	0,01	0,01	0,01	0,04	0,09	0,12	0,18	0,22	0,33	0,38	0,69	22930
		Mixta	0,01	0,01	0,01	0,04	0,09	0,11	0,18	0,23	0,37	0,44	0,76	11594

Tabla 50. Distribución del marcador C5:1 (μmol/L) en la población neonatal menor de 8 días de vida en función del peso al nacimiento (inferior/superior a 1500 g) y tipo de alimentación (materna, artificial o mixta).

	POBLACION NORMAL (<8d según peso al nacimiento y alimentación)													
			Percentiles											
Analito	Peso (g)	Alimentación	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C2	≤2500	Materna	7,96	10,15	11,47	18,58	31,51	36,56	46,76	51,92	68,98	88,94		2211
		Artificial	8,35	10,61	12,29	20,07	33,32	39,11	54,16	64,97	77,66	90,31		3196
		Mixta	8,27	10,88	12,43	20,40	33,32	38,83	49,18	58,73	75,46			1608
	2501-4100	Materna	7,69	9,85	11,25	18,31	30,42	34,94	44,93	49,25	59,04	63,27	70,57	46384
		Artificial	7,98	10,18	11,57	18,50	30,16	34,42	45,05	49,25	63,05	75,61	91,14	20301
		Mixta	8,00	10,27	11,69	18,66	30,87	35,39	45,49	50,40	63,94	72,98	79,98	10078
	>4100	Materna	7,99	9,83	11,37	18,55	31,75	36,10	46,49	51,46	59,84			1594
		Artificial	7,55	10,16	11,70	19,04	31,03	35,61	49,96	52,77				698
		Mixta	8,56	10,81	12,33	19,60	35,38	38,28	49,50	52,10				497
C3	≤2500	Materna	0,33	0,50	0,62	1,28	2,45	2,97	4,00	4,37	5,50	6,20		2211
		Artificial	0,39	0,56	0,68	1,38	2,74	3,24	4,63	5,19	7,44	8,01		3196
		Mixta	0,37	0,54	0,67	1,39	2,62	3,13	4,37	4,87	7,26			1608
	2501-4100	Materna	0,35	0,50	0,61	1,28	2,47	2,94	4,08	4,55	5,74	6,22	7,73	46385
		Artificial	0,39	0,55	0,67	1,35	2,57	3,06	4,17	4,60	5,83	6,84	10,00	20301
		Mixta	0,38	0,54	0,66	1,37	2,63	3,13	4,23	4,66	5,98	6,75	7,44	10078
	>4100	Materna	0,38	0,51	0,61	1,36	2,75	3,35	4,43	5,08	6,47			1594
		Artificial	0,43	0,58	0,70	1,44	2,79	3,39	4,46	4,82				698
		Mixta	0,38	0,60	0,76	1,57	2,99	3,51	4,90	5,71				497
C16	≤2500	Materna	0,90	1,23	1,44	2,35	3,82	4,34	5,47	6,07	7,46	7,61		2211
		Artificial	0,70	1,02	1,21	2,07	3,37	3,87	4,92	5,69	7,42	7,77		3196
		Mixta	0,84	1,17	1,35	2,20	3,61	4,10	5,19	5,61	7,44			1608
	2501-4100	Materna	0,92	1,23	1,44	2,43	3,93	4,46	5,55	6,06	7,28	7,81	9,66	46386
		Artificial	0,80	1,06	1,23	2,05	3,35	3,85	5,01	5,48	6,63	7,40	8,27	20386
		Mixta	0,89	1,21	1,41	2,37	3,83	4,34	5,46	5,96	7,02	7,70	8,78	10078
	>4100	Materna	0,93	1,30	1,57	2,54	4,06	4,70	5,70	6,36	8,99			1594
		Artificial	0,88	1,21	1,34	2,21	3,55	4,02	5,03	5,93				698
		Mixta	0,99	1,27	1,49	2,58	4,18	4,64	5,53	6,05				497

Tabla 51. Distribución de los marcadores C2, C3 y C16 (μmol/L) en la población neonatal menor de 8 días de vida en función del peso al nacimiento (inferior a 2500, entre 2500 y 4100 y superior a 4100 g) y tipo de alimentación (materna, artificial o mixta).

*Parte experimental*

	POBLACION NORMAL (<8d según peso al nacimiento y alimentación)													
			Percentiles											
Analito	Peso (g)	Alimentacion	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C8:1	≤1500	Materna	0,02	0,03	0,04	0,07	0,11	0,14	0,19	0,21	0,29			1000
		Artificial	0,03	0,04	0,05	0,10	0,16	0,18	0,24	0,27			806	
		Mixta	0,03	0,05	0,05	0,09	0,15	0,17	0,24	0,27			302	
	1501-2500	Materna	0,02	0,03	0,04	0,07	0,12	0,15	0,21	0,23	0,35			1209
		Artificial	0,03	0,05	0,06	0,11	0,17	0,20	0,26	0,28	0,34	0,42		2389
		Mixta	0,03	0,05	0,05	0,10	0,17	0,19	0,25	0,26	0,30			1305
	>2500	Materna	0,02	0,03	0,03	0,06	0,11	0,13	0,17	0,19	0,24	0,26	0,47	47895
		Artificial	0,03	0,05	0,06	0,10	0,16	0,18	0,23	0,25	0,32	0,35	0,63	20992
		Mixta	0,02	0,04	0,05	0,08	0,14	0,16	0,21	0,24	0,28	0,29	0,40	10564
C5	≤1500	Materna	0,05	0,07	0,08	0,14	0,26	0,34	0,60	0,68	1,02			1000
		Artificial	0,05	0,08	0,09	0,17	0,73	0,88	1,32	1,64				806
		Mixta	0,06	0,08	0,10	0,17	0,56	0,67	0,99	1,12				302
	1501-2500	Materna	0,05	0,07	0,09	0,15	0,27	0,38	0,89	1,13	2,12			1209
		Artificial	0,06	0,09	0,10	0,18	0,65	0,82	1,13	1,25	1,57	3,11		2389
		Mixta	0,06	0,09	0,10	0,17	0,55	0,71	1,06	1,39	1,95			1305
	>2500	Materna	0,05	0,07	0,08	0,14	0,24	0,29	0,54	0,68	0,98	1,12	1,56	47895
		Artificial	0,05	0,07	0,08	0,14	0,25	0,39	0,77	0,90	1,22	1,41	1,92	20992
		Mixta	0,05	0,07	0,08	0,14	0,32	0,53	0,87	0,99	1,33	1,48	4,58	10564

**Tabla 52. Distribución de los marcadores C8:1 y C5 (μmol/L) en la población neonatal menor de 8 días de vida según el peso al nacimiento (inferior a 1500, entre 1500 y 2500 y superior a 2500 g) y tipo de alimentación (materna, artificial o mixta).**

*Parte experimental*

POBLACION NORMAL (<8d según peso al nacimiento y alimentación)													
Analito	Peso (g)	Alimentacion	Percentiles										
			1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%
C4	≤1500	Materna	0,10	0,16	0,19	0,33	0,55	0,70	0,96				
		Artificial	0,11	0,15	0,17	0,30	0,54	0,67					
		Mixta	0,17	0,17	0,22	0,31	0,51	0,60					
	1501-2500	Materna	0,10	0,14	0,17	0,28	0,48	0,55	0,71	0,81	1,05	1,18	
		Artificial	0,10	0,14	0,17	0,28	0,49	0,58	0,79	0,83	1,21		
		Mixta	0,10	0,14	0,17	0,28	0,46	0,55	0,68	0,74	0,89		
	2501-4100	Materna	0,09	0,12	0,15	0,25	0,43	0,49	0,65	0,72	0,86	0,95	1,12
		Artificial	0,10	0,14	0,16	0,27	0,46	0,53	0,69	0,76	0,98	1,14	1,44
		Mixta	0,09	0,13	0,15	0,26	0,44	0,51	0,69	0,76	1,03	1,15	2,47
	>4100	Materna	0,08	0,12	0,14	0,24	0,41	0,47	0,63	0,71			
		Artificial	0,09	0,13	0,15	0,26	0,45	0,50	0,68	0,77	1,32		
		Mixta	0,09	0,12	0,14	0,25	0,43	0,51	0,64	0,67			
C5OH	≤1500	Materna	0,06	0,08	0,10	0,14	0,22	0,26	0,39				
		Artificial	0,05	0,06	0,07	0,12	0,22	0,27					
		Mixta	0,08	0,09	0,10	0,14	0,22	0,29					
	1501-2500	Materna	0,06	0,08	0,09	0,14	0,21	0,24	0,32	0,35	0,49	0,84	
		Artificial	0,06	0,08	0,09	0,13	0,20	0,23	0,31	0,36	0,95		
		Mixta	0,06	0,08	0,09	0,14	0,21	0,25	0,31	0,34	0,44		
	2501-4100	Materna	0,06	0,08	0,09	0,13	0,20	0,23	0,30	0,34	0,50	0,58	0,76
		Artificial	0,06	0,08	0,09	0,13	0,20	0,23	0,30	0,34	0,48	0,57	0,91
		Mixta	0,06	0,08	0,09	0,13	0,20	0,23	0,32	0,37	0,61	0,80	1,40
	>4100	Materna	0,06	0,08	0,09	0,14	0,22	0,26	0,36	0,44			
		Artificial	0,06	0,07	0,09	0,13	0,20	0,24	0,32	0,36	0,58		
		Mixta	0,05	0,08	0,09	0,14	0,21	0,25	0,32	0,34			
C10	≤1500	Materna	0,03	0,04	0,05	0,09	0,15	0,18	0,33				
		Artificial	0,02	0,04	0,05	0,11	0,19	0,21					
		Mixta	0,04	0,04	0,05	0,10	0,17	0,26					
	1501-2500	Materna	0,03	0,05	0,06	0,10	0,16	0,19	0,25	0,28	0,40	0,42	
		Artificial	0,04	0,06	0,07	0,11	0,20	0,24	0,35	0,42	0,90		
		Mixta	0,04	0,05	0,06	0,11	0,17	0,20	0,26	0,32	0,59		
	2501-4100	Materna	0,03	0,05	0,06	0,09	0,15	0,17	0,24	0,27	0,36	0,40	0,59
		Artificial	0,04	0,05	0,06	0,11	0,18	0,21	0,30	0,35	0,45	0,52	0,78
		Mixta	0,03	0,05	0,06	0,10	0,18	0,21	0,29	0,33	0,49	0,55	0,96
	>4100	Materna	0,03	0,05	0,06	0,09	0,15	0,17	0,26	0,30			
		Artificial	0,04	0,05	0,06	0,10	0,17	0,20	0,27	0,32	0,41		
		Mixta	0,03	0,05	0,06	0,11	0,17	0,20	0,27	0,31			
C10:1	≤1500	Materna	0,01	0,03	0,03	0,06	0,11	0,13	0,24				
		Artificial	0,03	0,03	0,04	0,08	0,12	0,15					
		Mixta	0,35	0,04	0,05	0,07	0,17	0,18					
	1501-2500	Materna	0,02	0,03	0,04	0,08	0,13	0,16	0,20	0,23	0,25	0,25	
		Artificial	0,03	0,04	0,05	0,09	0,15	0,16	0,22	0,24	0,36		
		Mixta	0,02	0,04	0,05	0,08	0,14	0,16	0,20	0,23	0,33		
	2501-4100	Materna	0,02	0,03	0,04	0,07	0,12	0,14	0,18	0,20	0,26	0,31	0,69
		Artificial	0,02	0,04	0,05	0,08	0,13	0,15	0,20	0,22	0,29	0,33	0,62
		Mixta	0,02	0,04	0,04	0,08	0,13	0,15	0,19	0,21	0,29	0,33	0,42
	>4100	Materna	0,02	0,03	0,04	0,07	0,12	0,13	0,19	0,24			
		Artificial	0,02	0,03	0,04	0,08	0,13	0,15	0,19	0,20	0,26		
		Mixta	0,02	0,03	0,04	0,08	0,12	0,14	0,20	0,21			

Tabla 53.a Distribución de diversos marcadores (μmol/L) en la población neonatal menor de 8 días de vida, según el peso al nacimiento (inferior a 1500, entre 1500 y 2500, entre 2500 y 4100 y superior a 4100 g) y tipo de alimentación (materna, artificial o mixta).

## Parte experimental

POBLACION NORMAL (<8d según peso al nacimiento y alimentación)														
Analito			Percentiles											
	Peso (g)	Alimentacion	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C14	≤1500	Materna	0,04	0,09	0,11	0,20	0,38	0,47	0,70					149
		Artificial	0,08	0,09	0,11	0,18	0,31	0,36						54
		Mixta	0,05	0,05	0,08	0,17	0,36	0,43						26
	1501-2500	Materna	0,06	0,09	0,10	0,17	0,30	0,35	0,46	0,49	0,56	0,56		2389
		Artificial	0,07	0,10	0,12	0,19	0,35	0,41	0,55	0,58	1,00			1209
		Mixta	0,07	0,09	0,11	0,19	0,32	0,38	0,51	0,58	0,91			1305
	2501-4100	Materna	0,06	0,08	0,10	0,16	0,27	0,32	0,42	0,46	0,56	0,64	0,82	20301
		Artificial	0,07	0,09	0,11	0,18	0,32	0,37	0,48	0,53	0,65	0,69	0,84	46386
		Mixta	0,07	0,09	0,10	0,17	0,31	0,35	0,46	0,50	0,66	0,73	0,78	10078
	>4100	Materna	0,06	0,08	0,09	0,16	0,27	0,32	0,42	0,48				698
		Artificial	0,06	0,09	0,11	0,17	0,31	0,36	0,45	0,50	0,59			1594
		Mixta	0,07	0,09	0,11	0,18	0,31	0,35	0,49	0,52				497
C18:2	≤1500	Materna	0,06	0,11	0,14	0,26	0,55	0,72	1,03					149
		Artificial	0,08	0,08	0,09	0,23	0,42	0,48						54
		Mixta	0,08	0,09	0,12	0,23	0,62	0,84						26
	1501-2500	Materna	0,06	0,12	0,15	0,28	0,47	0,52	0,67	0,73	0,92	0,95		2389
		Artificial	0,06	0,09	0,11	0,21	0,37	0,44	0,57	0,60	1,18			1209
		Mixta	0,08	0,12	0,16	0,26	0,45	0,51	0,66	0,72	0,84			1305
	2501-4100	Materna	0,07	0,11	0,14	0,24	0,39	0,45	0,57	0,63	0,76	0,86	1,16	20300
		Artificial	0,05	0,07	0,09	0,18	0,32	0,38	0,50	0,55	0,68	0,75	1,00	46374
		Mixta	0,05	0,08	0,10	0,20	0,34	0,39	0,50	0,55	0,66	0,71	1,23	10076
	>4100	Materna	0,07	0,11	0,13	0,22	0,36	0,41	0,52	0,57				698
		Artificial	0,05	0,07	0,09	0,17	0,29	0,35	0,47	0,51	0,67			1594
		Mixta	0,03	0,08	0,10	0,18	0,32	0,37	0,45	0,49				496
C14:2	≤1500	Materna	0,01	0,01	0,01	0,03	0,05	0,08						54
		Artificial	0,01	0,01	0,02	0,03	0,08	0,09	0,16					149
		Mixta	0,02	0,02	0,02	0,04	0,07	0,09						26
	1501-2500	Materna	0,01	0,01	0,01	0,03	0,06	0,07	0,10	0,13	0,17			1206
		Artificial	0,01	0,01	0,02	0,03	0,06	0,08	0,11	0,12	0,18	0,20		2379
		Mixta	0,01	0,01	0,02	0,03	0,06	0,08	0,11	0,13	0,15			1299
	2501-4100	Materna	0,01	0,01	0,01	0,02	0,05	0,06	0,09	0,11	0,14	0,16	0,22	46147
		Artificial	0,01	0,01	0,01	0,03	0,05	0,06	0,09	0,11	0,15	0,16	0,58	20184
		Mixta	0,01	0,01	0,01	0,03	0,05	0,06	0,10	0,11	0,15	0,17	0,30	10015
	>4100	Materna	0,01	0,01	0,01	0,02	0,05	0,05	0,09	0,10	0,12			1586
		Artificial	0,01	0,01	0,01	0,02	0,05	0,06	0,08	0,10				697
		Mixta	0,00	0,01	0,01	0,03	0,05	0,06	0,08	0,09				492
C16-1OH	≤1500	Materna	0,01	0,01	0,03	0,05	0,08	0,10						54
		Artificial	0,01	0,02	0,02	0,05	0,08	0,09	0,17					149
		Mixta	0,02	0,02	0,03	0,04	0,07	0,08						26
	1501-2500	Materna	0,01	0,02	0,03	0,05	0,08	0,09	0,11	0,12	0,15			1206
		Artificial	0,01	0,02	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,11	0,14	0,16		2379
		Mixta	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,09	0,11	0,12	0,16			1299
	2501-4100	Materna	0,01	0,02	0,03	0,05	0,08	0,09	0,11	0,13	0,16	0,17	0,21	46147
		Artificial	0,01	0,02	0,02	0,04	0,06	0,07	0,09	0,10	0,12	0,14	0,91	20184
		Mixta	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,10	0,11	0,14	0,15	0,19	10015
	>4100	Materna	0,01	0,02	0,03	0,05	0,07	0,08	0,11	0,13	0,16			1586
		Artificial	0,01	0,01	0,02	0,04	0,06	0,07	0,10	0,11				697
		Mixta	0,01	0,02	0,02	0,04	0,06	0,08	0,09	0,13				492

Tabla 53.b Distribución de diversos marcadores (μmol/L) en la población neonatal menor de 8 días de vida, según el peso al nacimiento (inferior a 1500, entre 1500 y 2500, entre 2500 y 4100 y superior a 4100 g) y tipo de alimentación (materna, artificial o mixta).

Al igual que en el apartado anterior, se ha repetido el análisis en el grupo de niños con pesos comprendidos solo entre 1500 y 4100 g con el fin de aislar las posibles diferencias debidas a alimentaciones especiales o parenterales sobre los niveles de AC. Para la población neonatal entre 1500 y 4100 g, agrupados de la misma manera, los valores de los diferentes parámetros en función del tipo de alimentación y del peso y el tipo de alimentación, se presentan en las tablas siguientes (Tabla 54 a-c).

*Parte experimental*

POBLACION NORMAL (<8d según peso al nacimiento y alimentación)														
Analito	Peso (g)	Alimentacion	Percentiles											N
			1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	
C0	1501-2500	Materna	7,06	9,61	10,98	19,18	34,17	40,03	50,85	56,42	71,69	100,55		1209
		Artificial	7,62	10,00	11,83	21,20	36,75	42,98	57,83	64,29	87,41			2389
		Mixta	7,73	10,57	12,29	20,81	37,64	44,60	59,74	69,12	95,77			1305
	2501-4100	Materna	6,62	8,70	10,14	17,62	30,32	35,19	46,46	51,27	64,88	72,73	89,06	46384
		Artificial	7,02	9,37	10,90	18,87	32,48	37,49	49,32	55,45	66,97	72,29	122,65	20301
		Mixta	6,83	9,04	10,65	18,74	31,81	37,34	48,89	55,58	70,64	73,79	135,74	10078
C2	1501-2500	Materna	8,01	10,30	11,82	19,03	32,05	36,86	47,41	52,81	86,81	83,79		1209
		Artificial	8,30	10,61	12,37	20,26	33,73	40,35	55,01	63,83	76,25			2389
		Mixta	8,47	10,96	12,47	20,67	33,46	38,83	49,91	58,96	76,84			1305
	2501-4100	Materna	7,69	9,85	11,25	18,31	30,42	34,94	44,92	49,25	59,04	63,27	70,57	46384
		Artificial	7,98	10,18	11,57	18,50	30,16	34,42	45,05	49,25	63,05	75,61	91,14	20301
		Mixta	8,00	10,27	11,69	18,66	30,87	35,39	45,49	50,40	63,94	72,98	79,98	10078
C3	1501-2500	Materna	0,32	0,51	0,64	1,33	2,51	3,03	4,07	4,72	5,50	8,12		1209
		Artificial	0,39	0,56	0,69	1,40	2,77	3,29	4,66	5,19	7,45			2389
		Mixta	0,41	0,55	0,69	1,40	2,63	3,08	4,38	5,08	7,29			1305
	2501-4100	Materna	0,35	0,50	0,61	1,28	2,47	2,94	4,08	4,55	5,74	6,22	7,73	46384
		Artificial	0,39	0,55	0,67	1,35	2,57	3,06	4,17	4,60	5,83	6,84	10,00	20301
		Mixta	0,38	0,54	0,66	1,37	2,63	3,13	4,23	4,66	5,98	6,75	7,44	10078
C4	1501-2500	Materna	0,10	0,14	0,17	0,28	0,49	0,58	0,79	0,83	1,21	1,18		1209
		Artificial	0,10	0,14	0,17	0,28	0,48	0,55	0,71	0,81	1,05			2389
		Mixta	0,10	0,14	0,17	0,28	0,46	0,55	0,68	0,74	0,89			1305
	2501-4100	Materna	0,10	0,14	0,16	0,27	0,46	0,53	0,69	0,76	0,98	1,14	1,44	46384
		Artificial	0,09	0,12	0,15	0,25	0,43	0,49	0,65	0,72	0,86	0,95	1,12	20301
		Mixta	0,09	0,13	0,15	0,26	0,44	0,51	0,69	0,76	1,03	1,15	2,47	10078
C4OH	1501-2500	Materna	0,05	0,07	0,08	0,16	0,32	0,39	0,55	0,64	0,86	1,55		1209
		Artificial	0,05	0,07	0,08	0,13	0,23	0,28	0,40	0,44	1,17			2388
		Mixta	0,04	0,07	0,08	0,14	0,26	0,32	0,42	0,50	0,59			1305
	2501-4100	Materna	0,05	0,07	0,09	0,16	0,32	0,39	0,55	0,63	0,90	1,29	3,49	46384
		Artificial	0,04	0,06	0,07	0,13	0,23	0,28	0,42	0,52	0,98	1,26	2,38	20298
		Mixta	0,05	0,07	0,08	0,15	0,30	0,36	0,51	0,59	0,87	1,32	3,57	10076
C5	1501-2500	Materna	0,05	0,07	0,09	0,15	0,27	0,38	0,89	1,13	2,12	3,11		1209
		Artificial	0,06	0,09	0,10	0,18	0,65	0,82	1,13	1,25	1,57			2389
		Mixta	0,06	0,09	0,10	0,17	0,55	0,71	1,06	1,39	1,95			1305
	2501-4100	Materna	0,05	0,07	0,08	0,14	0,24	0,29	0,54	0,68	0,98	1,11	1,56	46385
		Artificial	0,05	0,07	0,08	0,14	0,25	0,39	0,77	0,89	1,19	1,38	1,91	20301
		Mixta	0,05	0,07	0,08	0,14	0,32	0,53	0,87	0,99	1,33	1,50	4,73	10078
C5:1	1501-2500	Materna	0,01	0,01	0,02	0,04	0,09	0,11	0,19	0,24	0,42	0,30		1119
		Artificial	0,01	0,01	0,02	0,04	0,09	0,12	0,19	0,21	0,30			2210
		Mixta	0,01	0,01	0,02	0,04	0,09	0,11	0,18	0,20	0,38			1195
	2501-4100	Materna	0,01	0,01	0,02	0,04	0,09	0,12	0,19	0,23	0,37	0,45	0,67	42673
		Artificial	0,01	0,01	0,02	0,04	0,09	0,12	0,19	0,23	0,33	0,42	0,70	18831
		Mixta	0,01	0,01	0,02	0,04	0,09	0,11	0,19	0,23	0,39	0,46		9108
C5OH	1501-2500	Materna	0,06	0,08	0,09	0,13	0,20	0,23	0,31	0,36	0,95	0,49		1207
		Artificial	0,06	0,08	0,09	0,14	0,21	0,24	0,31	0,35	0,44			2387
		Mixta	0,06	0,08	0,09	0,14	0,21	0,25	0,31	0,35	0,44			1303
	2501-4100	Materna	0,06	0,08	0,09	0,13	0,20	0,23	0,30	0,34	0,48	0,57	0,91	46319
		Artificial	0,06	0,08	0,09	0,13	0,20	0,23	0,30	0,34	0,50	0,58	0,76	20266
		Mixta	0,06	0,08	0,09	0,13	0,20	0,23	0,32	0,37	0,62	0,80	1,40	10066
C6DC	1501-2500	Materna	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,09	0,12	0,12	0,18	0,24		1207
		Artificial	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13	0,20			2382
		Mixta	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,16			1302
	2501-4100	Materna	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13	0,17	0,18	0,52	46316
		Artificial	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13	0,16	0,19	0,55	20252
		Mixta	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13	0,16	0,18	0,25	10054
C6	1501-2500	Materna	0,02	0,04	0,05	0,10	0,18	0,22	0,29	0,31	0,44	0,41		1207
		Artificial	0,02	0,04	0,05	0,10	0,18	0,22	0,30	0,33	0,40			2387
		Mixta	0,02	0,04	0,05	0,10	0,18	0,21	0,29	0,33	0,39			1303
	2501-4100	Materna	0,02	0,04	0,05	0,10	0,18	0,21	0,29	0,32	0,40	0,43	0,54	46319
		Artificial	0,02	0,04	0,05	0,09	0,17	0,21	0,28	0,31	0,39	0,43	0,81	20266
		Mixta	0,02	0,04	0,05	0,09	0,17	0,21	0,30	0,33	0,40	0,42	0,46	10066

Tabla 54.a Distribución de percentiles de diferentes marcadores (μmol/L) para la población neonatal menor de 8 días de vida y entre 1500 y 4100 g de peso al nacimiento, en función del tipo de alimentación (materna, artificial o mixta).

*Parte experimental*

POBLACION NORMAL (<8d según peso al nacimiento y alimentación)														
Analito	Peso (g)	Alimentación	Percentiles											N
			1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	
C8:1	1501-2500	Materna	0,02	0,03	0,04	0,07	0,12	0,15	0,21	0,23	0,35			1209
		Artificial	0,03	0,05	0,06	0,11	0,17	0,20	0,26	0,28	0,34	0,42		2383
		Mixta	0,03	0,05	0,05	0,10	0,17	0,19	0,25	0,26	0,30			1303
	2501-4100	Materna	0,02	0,03	0,03	0,06	0,11	0,13	0,17	0,19	0,24	0,26	0,36	46248
		Artificial	0,03	0,05	0,06	0,10	0,16	0,18	0,23	0,25	0,32	0,36	0,63	20263
		Mixta	0,02	0,04	0,05	0,08	0,14	0,16	0,21	0,24	0,28	0,29	0,41	10054
C8	1501-2500	Materna	0,02	0,03	0,04	0,07	0,12	0,14	0,18	0,19	0,37			1209
		Artificial	0,02	0,03	0,04	0,07	0,12	0,13	0,19	0,22	0,28	0,28		2389
		Mixta	0,02	0,03	0,04	0,07	0,12	0,14	0,20	0,22	0,25			1305
	2501-4100	Materna	0,02	0,03	0,04	0,07	0,11	0,13	0,18	0,20	0,26	0,29	0,48	46385
		Artificial	0,01	0,03	0,04	0,06	0,10	0,12	0,16	0,18	0,23	0,29	0,62	20301
		Mixta	0,01	0,03	0,04	0,07	0,11	0,13	0,17	0,19	0,28	0,34	0,47	10077
C10:1	1501-2500	Materna	0,03	0,04	0,05	0,09	0,15	0,16	0,22	0,24	0,36			1209
		Artificial	0,02	0,03	0,04	0,08	0,13	0,16	0,20	0,23	0,25	0,25		2383
		Mixta	0,02	0,04	0,05	0,08	0,14	0,16	0,20	0,23	0,33			1303
	2501-4100	Materna	0,02	0,04	0,05	0,08	0,13	0,15	0,20	0,22	0,29	0,33	0,62	46248
		Artificial	0,02	0,03	0,04	0,07	0,12	0,14	0,18	0,20	0,26	0,31	0,62	20263
		Mixta	0,02	0,04	0,04	0,08	0,13	0,15	0,19	0,21	0,29	0,33	0,42	10054
C10	1501-2500	Materna	0,04	0,06	0,07	0,11	0,20	0,24	0,35	0,42	0,90			1209
		Artificial	0,03	0,05	0,06	0,10	0,16	0,19	0,25	0,28	0,40	0,42		2383
		Mixta	0,04	0,05	0,06	0,11	0,17	0,20	0,26	0,32	0,59			1303
	2501-4100	Materna	0,04	0,05	0,06	0,11	0,18	0,21	0,30	0,35	0,45	0,52	0,78	46248
		Artificial	0,03	0,05	0,06	0,09	0,15	0,17	0,24	0,27	0,36	0,40	0,59	20263
		Mixta	0,03	0,05	0,06	0,10	0,18	0,21	0,28	0,33	0,49	0,55	0,96	10054
C3DC	1501-2500	Materna	0,01	0,02	0,02	0,04	0,08	0,09	0,13	0,14	0,17			1201
		Artificial	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,12	0,15	0,22	0,25		2359
		Mixta	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,09	0,13	0,16	0,20			1290
	2501-4100	Materna	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,12	0,14	0,18	0,21	0,30	46020
		Artificial	0,01	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,11	0,13	0,17	0,19	0,59	20111
		Mixta	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,14	0,19	0,20		9956
C4DC	1501-2500	Materna	0,05	0,08	0,10	0,16	0,26	0,29	0,40	0,43	0,50			1202
		Artificial	0,05	0,08	0,09	0,16	0,26	0,30	0,39	0,42	0,57	0,76		2378
		Mixta	0,05	0,08	0,09	0,16	0,25	0,29	0,38	0,43	0,48			1297
	2501-4100	Materna	0,06	0,09	0,11	0,17	0,28	0,32	0,42	0,46	0,57	0,62	0,90	46092
		Artificial	0,06	0,09	0,11	0,17	0,28	0,32	0,43	0,47	0,58	0,66	0,83	20116
		Mixta	0,06	0,09	0,10	0,17	0,28	0,32	0,41	0,45	0,55	0,65		9985
C5DC	1501-2500	Materna	0,01	0,02	0,02	0,05	0,09	0,11	0,17	0,20	0,27			1202
		Artificial	0,01	0,02	0,02	0,05	0,08	0,10	0,17	0,21	0,24	0,28		2378
		Mixta	0,01	0,02	0,02	0,05	0,09	0,11	0,17	0,19	0,21			1297
	2501-4100	Materna	0,01	0,02	0,02	0,05	0,08	0,10	0,16	0,17	0,23	0,25	0,53	46092
		Artificial	0,01	0,02	0,02	0,04	0,08	0,09	0,15	0,17	0,23	0,25	0,60	20116
		Mixta	0,01	0,02	0,02	0,04	0,08	0,10	0,15	0,17	0,22	0,23		9985
C12	1501-2500	Materna	0,05	0,06	0,08	0,16	0,40	0,54	0,87	0,96	2,49			1202
		Artificial	0,04	0,06	0,07	0,14	0,30	0,37	0,56	0,68	1,03	1,22		2378
		Mixta	0,05	0,06	0,07	0,15	0,35	0,45	0,73	0,83	1,50			1297
	2501-4100	Materna	0,04	0,06	0,07	0,15	0,39	0,50	0,77	0,90	1,27	1,54	1,98	46092
		Artificial	0,05	0,06	0,07	0,13	0,31	0,39	0,63	0,74	1,06	1,33	1,93	20116
		Mixta	0,05	0,06	0,08	0,16	0,40	0,51	0,74	0,91	1,44	1,53		9985
C14:2	1501-2500	Materna	0,01	0,01	0,01	0,03	0,06	0,07	0,11	0,13	0,17			1207
		Artificial	0,01	0,01	0,02	0,03	0,06	0,08	0,11	0,12	0,18	0,20		2382
		Mixta	0,01	0,01	0,02	0,03	0,06	0,08	0,11	0,12	0,15			1305
	2501-4100	Materna	0,01	0,01	0,01	0,02	0,05	0,06	0,09	0,11	0,14	0,16	0,24	46215
		Artificial	0,01	0,01	0,01	0,03	0,05	0,06	0,09	0,11	0,15	0,16	0,57	20254
		Mixta	0,01	0,01	0,01	0,03	0,05	0,06	0,10	0,11	0,15	0,17	0,30	10039
C14:1	1501-2500	Materna	0,03	0,04	0,05	0,11	0,25	0,32	0,48	0,59	1,13			1197
		Artificial	0,03	0,04	0,05	0,10	0,22	0,26	0,38	0,49	0,65	0,79		2321
		Mixta	0,03	0,04	0,05	0,11	0,23	0,28	0,41	0,54	0,65			1267
	2501-4100	Materna	0,03	0,04	0,05	0,09	0,22	0,27	0,40	0,47	0,64	0,74	0,96	45596
		Artificial	0,03	0,04	0,04	0,09	0,20	0,24	0,37	0,44	0,64	0,74	0,98	19804
		Mixta	0,03	0,04	0,05	0,10	0,23	0,28	0,41	0,48	0,68	0,83		9847
C14	1501-2500	Materna	0,07	0,10	0,12	0,19	0,35	0,41	0,55	0,58	1,00			1209
		Artificial	0,06	0,09	0,10	0,17	0,30	0,35	0,46	0,49	0,56	0,56		2389
		Mixta	0,07	0,09	0,11	0,19	0,32	0,38	0,51	0,58	0,91			1305
	2501-4100	Materna	0,07	0,09	0,11	0,18	0,32	0,37	0,48	0,53	0,65	0,69	0,84	46385
		Artificial	0,06	0,08	0,10	0,16	0,27	0,32	0,42	0,46	0,56	0,64	0,82	20301
		Mixta	0,07	0,09	0,10	0,17	0,31	0,35	0,46	0,50	0,66	0,73	0,78	10078

Tabla 54.b Distribución de percentiles de diferentes marcadores ( $\mu\text{mol/L}$ ) para la población neonatal menor de 8 días de vida y entre 1500 y 4100 g de peso al nacimiento, en función del tipo de alimentación (materna, artificial o mixta).



*Parte experimental*

			POBLACION NORMAL (<8d según peso al nacimiento y alimentación)											
			Percentiles											
Analito	Peso (g)	Alimentacion	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C16	1501-2500	Materna	0,79	1,22	1,42	2,35	3,80	4,25	5,57	6,48	7,60	7,85		1209
		Artificial	0,73	1,01	1,20	2,06	3,35	3,81	4,97	5,71	7,64			2389
		Mixta	0,84	1,15	1,34	2,19	3,58	4,10	5,19	5,81	7,49			1305
	2501-4100	Materna	0,92	1,23	1,44	2,43	3,93	4,46	5,55	6,06	7,28	7,81	9,66	46385
		Artificial	0,80	1,06	1,23	2,05	3,35	3,85	5,01	5,48	6,63	7,40	8,27	20301
		Mixta	0,89	1,21	1,41	2,37	3,83	4,34	5,46	5,96	7,02	7,70	8,78	10077
C18:2	1501-2500	Materna	0,06	0,09	0,11	0,21	0,37	0,44	0,57	0,60	1,18	0,95		1197
		Artificial	0,06	0,12	0,15	0,28	0,47	0,52	0,68	0,73	0,92			2321
		Mixta	0,08	0,12	0,16	0,26	0,45	0,51	0,66	0,70	0,84			1267
	2501-4100	Materna	0,05	0,07	0,09	0,18	0,32	0,38	0,50	0,55	0,68	0,75	1,01	45596
		Artificial	0,07	0,11	0,14	0,24	0,39	0,45	0,57	0,63	0,76	0,86	1,17	19804
		Mixta	0,05	0,08	0,10	0,20	0,34	0,39	0,50	0,55	0,66	0,71		9847
C18:1	1501-2500	Materna	0,63	0,85	0,95	1,42	2,08	2,36	2,93	3,12	3,75	4,32		1209
		Artificial	0,67	0,88	1,02	1,53	2,35	2,68	3,35	3,70	4,23			2389
		Mixta	0,71	0,91	1,02	1,52	2,32	2,60	3,30	3,56	3,84			1305
	2501-4100	Materna	0,62	0,80	0,91	1,38	2,05	2,30	2,84	3,05	3,64	3,93	5,04	46384
		Artificial	0,65	0,84	0,95	1,45	2,18	2,47	3,05	3,27	3,81	4,04	5,40	20301
		Mixta	0,67	0,83	0,94	1,43	2,10	2,35	2,91	3,14	3,80	4,25	4,77	10078
C18	1501-2500	Materna	0,34	0,45	0,51	0,82	1,24	1,40	1,70	1,78	2,64	3,03		1209
		Artificial	0,32	0,42	0,48	0,77	1,19	1,35	1,76	1,87	2,38			2389
		Mixta	0,35	0,44	0,50	0,79	1,23	1,41	1,76	1,87	2,29			1305
	2501-4100	Materna	0,35	0,46	0,52	0,83	1,27	1,44	1,79	1,93	2,34	2,52	2,98	46385
		Artificial	0,29	0,39	0,45	0,73	1,16	1,32	1,67	1,81	2,15	2,39	3,36	20301
		Mixta	0,34	0,44	0,50	0,79	1,24	1,40	1,74	1,91	2,24	2,39	3,16	10077
C14OH	1501-2500	Materna	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,08	0,09	0,11	0,12		1197
		Artificial	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,08	0,10	0,12			2321
		Mixta	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,07	0,09	0,13			1267
	2501-4100	Materna	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,15	45606
		Artificial	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,07	0,08	0,10	0,12	0,54	19805
		Mixta	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13		9849
C16OH	1501-2500	Materna	0,01	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,08	0,09	0,15	0,15		1197
		Artificial	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,04	0,07	0,08	0,14			2321
		Mixta	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,07	0,09	0,12			1267
	2501-4100	Materna	0,01	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,07	0,09	0,12	0,14	0,27	45606
		Artificial	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,90	19805
		Mixta	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,07	0,09	0,12	0,13		9849
C16-10H	1501-2500	Materna	0,01	0,02	0,03	0,05	0,08	0,09	0,11	0,12	0,15	0,16		1208
		Artificial	0,01	0,02	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,11	0,14			2386
		Mixta	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,09	0,11	0,12	0,16			1299
	2501-4100	Materna	0,01	0,02	0,03	0,05	0,08	0,09	0,11	0,13	0,16	0,17	0,22	46316
		Artificial	0,01	0,02	0,02	0,04	0,06	0,07	0,09	0,10	0,12	0,14	0,91	20228
		Mixta	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,10	0,11	0,14	0,15	0,19	10054
C16-10H	1501-2500	Materna	0,01	0,02	0,03	0,05	0,08	0,09	0,11	0,12	0,15	0,16		1208
		Artificial	0,01	0,02	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,11	0,14			2386
		Mixta	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,09	0,11	0,12	0,16			1299
	2501-4100	Materna	0,01	0,02	0,03	0,05	0,08	0,09	0,11	0,13	0,16	0,17	0,22	46316
		Artificial	0,01	0,02	0,02	0,04	0,06	0,07	0,09	0,10	0,12	0,14	0,91	20228
		Mixta	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,10	0,11	0,14	0,15	0,19	10054
C18-OH	1501-2500	Materna	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,06	0,07	0,08	0,13		1191
		Artificial	0,00	0,00	0,01	0,01	0,03	0,04	0,07	0,08	0,12			2331
		Mixta	0,00	0,00	0,01	0,01	0,03	0,04	0,07	0,08	0,10			1258
	2501-4100	Materna	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,06	0,07	0,10	0,11	0,16	45624
		Artificial	0,00	0,01	0,01	0,01	0,03	0,04	0,06	0,07	0,10	0,12	1,05	19811
		Mixta	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,06	0,07	0,10	0,12		9859

**Tabla 54.c Distribución de percentiles de diferentes marcadores (μmol/L) para la población neonatal menor de 8 días de vida y entre 1500 y 4100 g de peso al nacimiento, en función del tipo de alimentación (materna, artificial o mixta).**

Se presentan a continuación los resultados obtenidos de la comparación realizada en la población neonatal de peso al nacimiento entre 1500 y 4100 g, para C14, C16 y C18:1 en función del sexo (Tabla 55). En los 3 parámetros se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p < 0,001$ ).



## Parte experimental

POBLACION NORMAL (según edad a la toma de muestra)															
Percentiles															
Analito	Sexo	1%	5%	10%	25%	50%	75%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C14	Varón	0,07	0,09	0,11	0,14	0,18	0,25	0,32	0,37	0,48	0,53	0,67	0,74	0,94	43018
	Mujer	0,06	0,09	0,10	0,13	0,17	0,22	0,29	0,34	0,44	0,49	0,62	0,65	0,78	41794
C16	Varón	0,91	1,23	1,42	1,83	2,41	3,13	3,92	4,45	5,59	6,13	7,40	7,80	8,77	43018
	Mujer	0,84	1,12	1,30	1,68	2,21	2,87	3,61	4,12	5,24	5,68	6,95	7,60	9,73	41794
C18:1	Varón	0,66	0,85	0,96	1,17	1,46	1,81	2,18	2,44	3,02	3,27	3,86	4,19	5,17	43017
	Mujer	0,61	0,79	0,89	1,09	1,36	1,68	2,03	2,28	2,85	3,07	3,66	3,91	5,14	41793

Tabla 55. Distribución de percentiles obtenidos para C14, C16 y C18:1 en la población neonatal normal (<8d) con peso al nacimiento entre 1500 y 4100 g, en función del sexo.

### 5.6. Distribución de los niveles de AC en sangre en función de la edad

Se ha realizado el análisis de la evolución de los niveles de AC en función de la edad tanto en cuanto a posibles cambios a lo largo de la primera semana de vida como entre los grupos globales de edad definidos al comienzo de este capítulo.

En todos los parámetros los niveles de las diferentes carnitinas en la primera semana de vida fueron significativamente diferentes de los observados en edades posteriores. En las siguientes tablas se presentan los percentiles de las diferentes AC (en  $\mu\text{mol/L}$ ) para la población neonatal normal en que la toma de muestra se realizó en la primera semana de vida (Tabla 56a-c) y a partir de la primera semana de vida, en función de los diferentes grupos de edad en que las diferencias resultaron estadísticamente significativas en cada caso (Tabla 57a-j).

De igual manera, en las Tabla 58 a-c se recogen las diferencias significativas encontradas para los distintos ratios de AC seleccionados, en función de los mismos grupos de edad.

*Parte experimental*

		POBLACION NORMAL (<8 d)							
		Edad a la toma de muestra (d)							
Analito	Percentil	0	1	2	3	4	5	6	7
C0	99%	56,33	60,52	50,35	50,80	51,30	47,60	45,52	44,70
	99.5%	68,71	73,63	56,56	57,72	57,14	52,81	49,65	49,85
	99.9%			75,53	72,21	73,53	66,88	63,97	67,39
	N	395	466	4578	22416	17196	20144	16724	10791
C2	99%	49,55	59,06	50,82	50,65	48,31	40,79	36,23	33,24
	99.5%	52,11	65,01	55,26	54,76	53,89	44,94	40,15	37,71
	99.9%			65,76	67,30	71,17	57,68	50,49	49,31
	N	395	466	4578	22417	17196	20142	16723	10791
C3	99%	4,26	4,97	4,98	4,73	4,40	3,40	2,73	2,42
	99.5%	4,75	5,15	5,58	5,20	4,88	3,79	3,14	2,98
	99.9%			7,51	6,74	6,34	5,13	4,55	4,48
	N	395	466	4578	22417	17196	20142	16723	10791
C4	99%	0,67	0,90	0,77	0,74	0,69	0,63	0,60	0,59
	99.5%	0,79	0,98	0,88	0,81	0,76	0,70	0,66	0,65
	99.9%			1,15	1,03	0,95	0,87	0,78	0,83
	N	395	466	4578	22416	17196	20142	16724	10790
C8	99%	0,18	0,20	0,19	0,19	0,18	0,16	0,16	0,16
	99.5%	0,21	0,23	0,21	0,21	0,20	0,18	0,18	0,18
	99.9%			0,28	0,27	0,27	0,25	0,25	0,24
	N	395	466	4578	22416	17196	20142	16724	10790
C16	99%	5,72	6,31	5,75	5,84	5,64	5,08	4,74	4,57
	99.5%	6,15	6,82	6,38	6,37	6,13	5,57	5,24	5,07
	99.9%			7,11	7,65	7,29	6,94	6,54	6,35
	N	395	466	4578	22416	17196	20142	16724	10790
C5	99%	1,12	0,90	0,62	0,72	0,88	0,87	0,81	0,83
	99.5%	1,69	1,07	0,76	0,83	1,02	1,02	0,95	0,99
	99.9%			1,30	1,18	1,35	1,40	1,31	1,48
	N	375	403	4053	19349	15109	19048	16179	10552
C14	99%	0,52	0,51	0,50	0,50	0,48	0,42	0,40	0,37
	99.5%	0,59	0,62	0,56	0,55	0,53	0,47	0,44	0,42
	99.9%			0,72	0,67	0,64	0,58	0,58	0,55
	N	375	403	4053	19349	15109	19048	16179	10552
C5:1	99%	0,22	0,23	0,20	0,20	0,20	0,18	0,17	0,18
	99.5%	0,25	0,28	0,23	0,24	0,24	0,22	0,21	0,22
	99.9%			0,33	0,35	0,39	0,33	0,35	0,40
	N	375	403	4053	19349	15109	19048	16179	10552
C6	99%	0,28	0,29	0,33	0,31	0,30	0,27	0,27	0,26
	99.5%	0,35	0,31	0,35	0,35	0,33	0,31	0,30	0,29
	99.9%			0,42	0,42	0,41	0,37	0,38	0,38
	N	375	403	4053	19349	15109	19048	16179	10552
C5OH	99%	0,47	0,37	0,30	0,31	0,31	0,30	0,29	0,29
	99.5%	0,56	0,52	0,33	0,36	0,35	0,34	0,33	0,31
	99.9%			0,52	0,53	0,50	0,46	0,51	0,43
	N	377	441	4306	20786	15917	19358	16282	10574
C4OH	99%	0,56	0,62	0,58	0,60	0,54	0,43	0,42	0,38
	99.5%	0,64	0,79	0,67	0,67	0,61	0,52	0,50	0,48
	99.9%			1,70	0,96	0,92	0,85	0,78	0,86
	N	392	458	4547	22187	17071	20075	16686	10771

Tabla 56.a Percentiles 99, 99.5 y 99.9 de diversos marcadores (μmol/L) en la población neonatal normal durante los primeros 7 días de vida.

*Parte experimental*

		POBLACION NORMAL (<8 d)							
		Edad a la toma de muestra (d)							
Analito	Percentil	0	1	2	3	4	5	6	7
C4DC	99%	0,42	0,47	0,42	0,42	0,42	0,42	0,43	0,42
	99.5%	0,50	0,52	0,46	0,46	0,46	0,46	0,48	0,47
	99.9%			0,59	0,57	0,54	0,55	0,62	0,55
	N	377	441	4306	20786	15917	19358	16282	10574
C5DC	99%	0,16	0,14	0,16	0,16	0,16	0,16	0,15	0,15
	99.5%	0,20	0,16	0,18	0,18	0,18	0,18	0,17	0,17
	99.9%			0,23	0,23	0,24	0,23	0,24	0,24
	N	377	441	4306	20786	15917	19358	16282	10574
C6DC	99%	0,12	0,13	0,12	0,11	0,11	0,12	0,11	0,12
	99.5%	0,13	0,14	0,14	0,12	0,12	0,13	0,13	0,13
	99.9%			0,18	0,16	0,16	0,17	0,17	0,18
	N	377	441	4306	20786	15917	19358	16282	10574
C3DC	99%	0,11	0,14	0,12	0,13	0,12	0,11	0,10	0,10
	99.5%	0,12	0,16	0,13	0,15	0,14	0,13	0,12	0,12
	99.9%			0,17	0,20	0,18	0,17	0,18	0,17
	N	392	463	4536	22128	16948	19976	16656	10752
C14:1	99%	0,36	0,51	0,43	0,45	0,43	0,34	0,29	0,27
	99.5%	0,41	0,60	0,49	0,52	0,52	0,40	0,36	0,32
	99.9%			0,73	0,74	0,70	0,60	0,55	0,47
	N	377	441	4306	20786	15917	19358	16282	10574
C14OH	99%	0,07	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07	0,06	0,07
	99.5%	0,07	0,09	0,08	0,09	0,09	0,08	0,08	0,08
	99.9%			0,10	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
	N	377	441	4306	20786	15917	19358	16282	10574
C16OH	99%	0,07	0,08	0,08	0,08	0,07	0,07	0,06	0,06
	99.5%	0,08	0,10	0,09	0,09	0,09	0,08	0,07	0,07
	99.9%			0,14	0,13	0,12	0,11	0,11	0,11
	N	377	441	4306	20786	15917	19358	16282	10574
C18:1	99%	2,95	3,44	2,66	2,83	2,97	3,06	2,97	2,91
	99.5%	3,93	3,76	2,84	3,03	3,20	3,29	3,24	3,20
	99.9%			3,47	3,53	3,68	3,90	3,76	4,06
	N	377	441	4306	20786	15917	19358	16282	10574
C18	99%	2,13	2,04	1,81	1,81	1,79	1,73	1,71	1,67
	99.5%	2,21	2,13	1,91	1,99	1,93	1,87	1,86	1,84
	99.9%			2,24	2,34	2,29	2,23	2,24	2,35
	N	377	441	4306	20786	15917	19358	16282	10574
C18-1OH	99%	0,07	0,10	0,08	0,08	0,08	0,07	0,07	0,07
	99.5%	0,09	0,10	0,10	0,10	0,10	0,08	0,08	0,08
	99.9%			0,13	0,13	0,14	0,11	0,12	0,12
	N	377	441	4306	20786	15917	19358	16282	10574
C18-OH	99%	0,06	0,06	0,07	0,07	0,06	0,06	0,05	0,06
	99.5%	0,07	0,07	0,08	0,08	0,07	0,07	0,06	0,07
	99.9%			0,10	0,11	0,10	0,11	0,09	0,11
	N	377	441	4306	20786	15917	19358	16282	10574

Tabla 56.b Percentiles 99, 99.5 y 99.9 de diversos marcadores ( $\mu\text{mol/L}$ ) en la población neonatal normal durante los primeros 7 días de vida.

*Parte experimental*

		POBLACION NORMAL (<8 d)							
		Edad a la toma de muestra (d)							
Analito	Percentil	0	1	2	3	4	5	6	7
C18:2	99%	0,53	0,53	0,45	0,46	0,56	0,56	0,57	0,56
	99.5%	0,59	0,57	0,53	0,51	0,62	0,62	0,63	0,63
	99.9%			0,64	0,64	0,73	0,75	0,76	0,78
	N	377	441	4306	20786	15917	19358	16282	10574
C12	99%	0,68	1,02	0,86	0,85	0,78	0,59	0,50	0,43
	99.5%	0,82	1,09	1,04	0,99	0,92	0,69	0,61	0,52
	99.9%			1,45	1,47	1,29	1,11	0,88	0,80
	N	377	441	4306	20786	15917	19358	16282	10574
C8:1	99%	0,22	0,20	0,19	0,21	0,22	0,21	0,21	0,21
	99.5%	0,23	0,22	0,22	0,23	0,24	0,23	0,23	0,23
	99.9%			0,26	0,27	0,30	0,28	0,29	0,30
	N	377	441	4306	20786	15917	19358	16282	10574
C10	99%	0,29	0,39	0,33	0,34	0,29	0,26	0,25	0,25
	99.5%	0,36	0,43	0,38	0,38	0,34	0,29	0,29	0,27
	99.9%			0,47	0,50	0,46	0,39	0,42	0,36
	N	377	441	4306	20786	15917	19358	16282	10574
C10:1	99%	0,21	0,20	0,20	0,21	0,20	0,19	0,19	0,18
	99.5%	0,23	0,21	0,21	0,23	0,22	0,21	0,21	0,20
	99.9%			0,29	0,30	0,28	0,28	0,27	0,27
	N	377	441	4306	20786	15917	19358	16282	10574
C16-1OH	99%	0,10	0,11	0,10	0,10	0,11	0,11	0,11	0,11
	99.5%	0,11	0,12	0,11	0,11	0,12	0,12	0,12	0,13
	99.9%			0,13	0,15	0,15	0,15	0,15	0,17
	N	392	458	4547	22187	17071	20075	16686	10771
C14:2	99%	0,09	0,09	0,09	0,10	0,10	0,09	0,09	0,09
	99.5%	0,11	0,09	0,10	0,11	0,12	0,11	0,10	0,10
	99.9%			0,15	0,15	0,15	0,15	0,14	0,13
	N	392	458	4547	22187	17071	20075	16686	10771

Tabla 56.c Percentiles 99, 99.5 y 99.9 de diversos marcadores ( $\mu\text{mol/L}$ ) en la población neonatal normal durante los primeros 7 días de vida.

*Parte experimental*

		POBLACION NORMAL (según edad a la toma de muestra)											
		Percentiles											
Analito	Edad TM	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C2	1SEM	7,87	10,06	11,48	18,63	30,81	35,43	45,97	50,90	63,58	70,04	84,55	92709
	2SEM	5,76	7,41	8,38	13,05	21,05	24,22	32,79	37,12	48,19	52,96	63,20	11402
	3SEM	4,63	6,03	6,95	11,30	19,63	23,49	33,24	37,73	53,03	55,14	58,44	3962
	4SEM	3,99	5,32	6,28	10,60	18,57	23,43	36,06	40,69	57,88	58,59	58,59	1247
	2-3MES	3,76	5,89	6,79	12,74	24,52	29,82	44,44	53,75	65,12	78,39	78,39	1827
	> 3MES	3,66	6,90	8,38	14,20	24,65	27,87	35,95	42,45	51,30	51,30	51,30	815
C4OH	1SEM	0,05	0,07	0,08	0,15	0,30	0,36	0,52	0,60	0,89	1,22	3,54	92702
	2SEM	0,04	0,06	0,07	0,11	0,20	0,25	0,40	0,53	1,18	1,71	6,30	11402
	3SEM	0,03	0,05	0,06	0,10	0,20	0,25	0,37	0,53	1,46	4,09		3958
	4SEM	0,03	0,04	0,05	0,09	0,17	0,22	0,40	0,47	0,73			1247
	2-3MES	0,03	0,04	0,05	0,09	0,19	0,23	0,37	0,45	1,37	1,94		2073
	> 3MES	0,03	0,05	0,06	0,12	0,23	0,29	0,44	0,50	0,64	0,64	0,64	815
C12	1SEM	0,05	0,06	0,07	0,15	0,37	0,48	0,74	0,87	1,26	1,45	1,98	92710
	2SEM	0,03	0,05	0,05	0,09	0,20	0,26	0,46	0,57	0,97	1,13	2,13	11402
	3SEM	0,03	0,04	0,05	0,08	0,16	0,19	0,34	0,47	0,80	0,82	0,91	3961
	4SEM	0,02	0,03	0,04	0,07	0,14	0,18	0,39	0,53	0,90	0,96	0,96	1247
	2-3MES	0,03	0,04	0,04	0,08	0,16	0,21	0,41	0,49	0,69	0,76	0,76	1827
	> 3MES	0,03	0,04	0,05	0,09	0,20	0,25	0,38	0,46	0,81	0,81	0,81	815
C14:1	1SEM	0,03	0,04	0,05	0,09	0,22	0,27	0,40	0,47	0,65	0,76	0,98	92711
	2SEM	0,02	0,03	0,03	0,06	0,13	0,17	0,28	0,33	0,56	0,63	0,89	11402
	3SEM	0,02	0,02	0,03	0,05	0,12	0,15	0,24	0,29	0,46	0,51	0,56	3962
	4SEM	0,01	0,02	0,02	0,05	0,10	0,13	0,24	0,30	0,38	0,38	0,38	1245
	2-3MES	0,02	0,02	0,03	0,06	0,12	0,16	0,26	0,33	0,48	0,51	0,51	1824
	> 3MES	0,02	0,03	0,04	0,08	0,17	0,22	0,31	0,32	0,49	0,49	0,49	815
C18	1SEM	0,33	0,43	0,50	0,80	1,24	1,41	1,76	1,91	2,29	2,45	2,98	92708
	2SEM	0,23	0,32	0,37	0,63	1,05	1,21	1,56	1,75	2,16	2,26	2,77	11402
	3SEM	0,13	0,19	0,23	0,42	0,78	0,90	1,23	1,35	1,74	1,76	1,96	3959
	4SEM	0,10	0,14	0,17	0,31	0,61	0,76	1,22	1,36	1,64	1,64	1,64	1246
	2-3MES	0,10	0,14	0,17	0,33	0,68	0,82	1,19	1,28	1,67	2,01	2,01	1824
	> 3MES	0,06	0,21	0,25	0,47	0,85	1,03	1,41	1,49	1,79	1,79	1,79	814
C18:1	1SEM	0,63	0,82	0,93	1,41	2,11	2,37	2,94	3,18	3,77	4,06	5,22	92708
	2SEM	0,41	0,55	0,65	1,12	1,82	2,08	2,68	2,87	3,62	4,17	4,57	11402
	3SEM	0,23	0,33	0,40	0,69	1,28	1,53	2,09	2,36	2,77	2,87	3,16	3962
	4SEM	0,17	0,25	0,31	0,53	1,04	1,33	2,04	2,21	2,87	2,88	2,88	1247
	2-3MES	0,21	0,27	0,34	0,68	1,39	1,68	2,23	2,53	3,48	3,56	3,56	1826
	> 3MES	0,14	0,47	0,55	0,95	1,53	1,72	2,35	2,56	3,62	3,62	3,62	815
C18OH	1SEM	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,06	0,07	0,10	0,12	0,16	90877
	2SEM	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,03	0,06	0,07	0,11	0,14	1,42	11219
	3SEM	0,00	0,00	0,01	0,01	0,03	0,04	0,06	0,07	0,13	0,16	0,38	3817
	4SEM	0,00	0,00	0,01	0,01	0,03	0,03	0,06	0,06	0,10	0,11	0,11	1186
	2-3MES	0,00	0,00	0,01	0,01	0,03	0,03	0,06	0,07	0,09	0,12	0,12	1751
	> 3MES	0,00	0,00	0,01	0,01	0,03	0,03	0,06	0,07	0,09	0,09	0,09	785
C18-1OH	1SEM	0,00	0,01	0,01	0,02	0,05	0,05	0,08	0,09	0,13	0,15	0,24	92195
	2SEM	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,07	0,09	0,13	0,16	1,31	11341
	3SEM	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,08	0,09	0,15	0,19	0,24	3905
	4SEM	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,08	0,10	0,14	0,15	0,15	1226
	2-3MES	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,08	0,08	0,15	0,16	0,16	1805
	> 3MES	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,08	0,09	0,12	0,12	0,12	806

Tabla 57.a Distribución de diferentes marcadores ( $\mu\text{mol/L}$ ) según la edad a la toma de muestra.

*Parte experimental*

		POBLACION NORMAL (según edad a la toma de muestra)											
		Percentiles											
Analito	Edad TM	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C4	1SEM	0,09	0,13	0,16	0,27	0,45	0,52	0,68	0,75	0,95	1,07	1,46	92710
	2SEM	0,09	0,12	0,15	0,24	0,39	0,44	0,58	0,65	0,90	0,99	1,32	11402
	3 - 4 SEM	0,07	0,10	0,12	0,22	0,37	0,43	0,58	0,65	0,98	1,84	3,56	5209
	2-3MES	0,07	0,10	0,12	0,22	0,39	0,45	0,63	0,69	0,89	0,90	0,90	1827
	> 3MES	0,08	0,11	0,14	0,25	0,44	0,53	0,71	0,82	1,31	1,31	1,31	815
C5	1SEM	0,05	0,07	0,08	0,14	0,27	0,41	0,82	0,96	1,32	1,50	2,07	92710
	2SEM	0,06	0,08	0,10	0,17	0,35	0,50	0,95	1,21	1,90	2,09	3,16	11402
	3 - 4 SEM	0,06	0,09	0,10	0,17	0,31	0,39	0,67	0,84	1,32	1,67	1,97	5209
	2-3MES	0,05	0,08	0,09	0,16	0,28	0,35	0,63	0,76	1,13	1,28	1,28	1827
	> 3MES	0,04	0,07	0,08	0,14	0,25	0,30	0,49	0,55	1,55	1,55	1,55	815
C10	1SEM	0,03	0,05	0,06	0,10	0,17	0,20	0,29	0,33	0,44	0,50	0,82	92681
	2SEM	0,03	0,05	0,06	0,09	0,15	0,17	0,24	0,28	0,43	0,48	0,79	11394
	3 - 4 SEM	0,02	0,04	0,05	0,09	0,15	0,17	0,23	0,28	0,43	0,47	0,81	5203
	2-3MES	0,02	0,04	0,05	0,09	0,15	0,18	0,24	0,29	0,32	0,33	0,33	1821
	> 3MES	0,02	0,04	0,06	0,11	0,21	0,28	0,43	0,56	0,86	0,86	0,86	815
C3DC	1SEM	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,12	0,13	0,18	0,20	0,29	91851
	2SEM	0,01	0,02	0,02	0,04	0,06	0,08	0,11	0,13	0,18	0,21	0,58	11321
	3 - 4 SEM	0,01	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,12	0,14	0,18	0,20	0,20	5138
	2-3MES	0,01	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,11	0,13	0,17	0,19	0,19	1795
	> 3MES	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,09	0,12	0,13	0,20	0,20	0,20	807
C16OH	1SEM	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,07	0,08	0,12	0,14	0,20	92076
	2SEM	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,06	0,07	0,11	0,13	1,31	11323
	3 - 4 SEM	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,07	0,08	0,10	0,11	0,17	5109
	2-3MES	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,12	1783
	> 3MES	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,04	0,08	0,09	0,14	0,14	0,14	797

Tabla 57.b Distribución de diferentes marcadores (μmol/L) según la edad a la toma de muestra.

		POBLACION NORMAL (según edad a la toma de muestra)											
		Percentiles											
Analito	Edad TM	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C6	1SEM	0,02	0,04	0,05	0,09	0,17	0,21	0,29	0,32	0,40	0,43	0,62	92566
	2 - 4 SEM	0,02	0,04	0,05	0,09	0,17	0,19	0,28	0,31	0,40	0,48	0,77	16597
	1-3MES	0,02	0,04	0,05	0,10	0,18	0,20	0,28	0,30	0,38	0,42		1826
	> 3MES	0,02	0,04	0,05	0,10	0,20	0,23	0,29	0,31	0,50			814
C8	1SEM	0,02	0,03	0,04	0,07	0,11	0,13	0,17	0,19	0,26	0,30	0,52	92708
	2 - 4 SEM	0,02	0,03	0,04	0,06	0,11	0,13	0,17	0,20	0,29	0,37	0,81	16611
	1-3MES	0,01	0,03	0,03	0,07	0,12	0,14	0,18	0,20	0,24	0,25		1827
	> 3MES	0,01	0,03	0,04	0,08	0,14	0,16	0,24	0,29	0,43			815
C14:2	1SEM	0,01	0,01	0,01	0,03	0,05	0,06	0,09	0,11	0,15	0,16	0,24	92394
	2 - 4 SEM	0,01	0,01	0,01	0,02	0,05	0,06	0,09	0,10	0,14	0,16	0,37	16560
	1-3MES	0,00	0,01	0,01	0,02	0,05	0,06	0,10	0,12	0,15	0,17		2048
	> 3MES	0,01	0,01	0,01	0,03	0,06	0,08	0,11	0,12	0,17			811

Tabla 57.c Distribución de diferentes marcadores (μmol/L) según la edad a la toma de muestra.

		POBLACION NORMAL (según edad a la toma de muestra)											
		Percentiles											
Analito	Edad TM	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C8:1	1SEM	0,02	0,03	0,04	0,08	0,14	0,16	0,21	0,23	0,29	0,31	0,52	92595
	2SEM	0,02	0,04	0,04	0,08	0,15	0,18	0,24	0,27	0,36	0,41	0,63	11395
	3 - 4 SEM	0,02	0,04	0,05	0,09	0,16	0,19	0,26	0,29	0,38	0,48	2,81	5202
	2-3MES	0,02	0,04	0,05	0,10	0,18	0,20	0,29	0,33	0,44	0,47	0,47	1826
	3-6MES	0,03	0,05	0,06	0,12	0,22	0,26	0,35	0,43	0,50	0,50	0,50	322
	6-12MES	0,02	0,04	0,06	0,11	0,18	0,22	0,34	0,35	0,35	0,35	0,35	163
	>12MES	0,01	0,03	0,03	0,07	0,14	0,16	0,21	0,28	0,33	0,33	0,33	327

Tabla 57.d Distribución de diferentes marcadores (μmol/L) según la edad a la toma de muestra.

*Parte experimental*

		POBLACION NORMAL (según edad a la toma de muestra)											
		Percentiles											
Analito	Edad TM	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C10:1	1SEM	0,02	0,04	0,04	0,08	0,13	0,15	0,19	0,22	0,28	0,33	0,50	92612
	2SEM	0,02	0,03	0,04	0,07	0,12	0,14	0,19	0,21	0,29	0,31	0,64	11395
	3SEM	0,01	0,03	0,04	0,07	0,12	0,14	0,18	0,21	0,24	0,26	0,37	3948
	4SEM	0,01	0,02	0,03	0,06	0,11	0,14	0,18	0,20	0,24	0,25		1244
	1-3 Mes	0,01	0,02	0,03	0,07	0,12	0,14	0,18	0,20	0,25			1819
	> 3MES	0,02	0,03	0,04	0,08	0,15	0,17	0,25	0,30	0,52			815
C16-10H	1SEM	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,15	0,16	0,20	92504
	2SEM	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,16	0,17	1,27	11381
	3SEM	0,01	0,01	0,01	0,03	0,06	0,07	0,10	0,11	0,13	0,14		3924
	4SEM	0,00	0,01	0,01	0,03	0,05	0,06	0,09	0,11	0,13			1229
	>1MES	0,00	0,01	0,01	0,03	0,06	0,07	0,09	0,11	0,12	0,13	0,15	4078

Tabla 57.e Distribución de diferentes marcadores (μmol/L) según la edad a la toma de muestra.

		POBLACION NORMAL (según edad a la toma de muestra)											
		Percentiles											
Analito	Edad TM	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C14	1SEM	0,07	0,09	0,10	0,17	0,31	0,36	0,47	0,52	0,64	0,69	0,85	92710
	2SEM	0,05	0,07	0,08	0,13	0,22	0,27	0,37	0,43	0,57	0,64	0,75	11402
	3SEM	0,03	0,05	0,06	0,10	0,19	0,23	0,32	0,37	0,52	0,54	1,14	3962
	4SEM	0,03	0,04	0,05	0,08	0,17	0,21	0,32	0,38	0,47	0,47	0,47	1245
	1-3MES	0,03	0,04	0,05	0,10	0,19	0,23	0,34	0,38	0,54	0,70	0,70	1824
	3-6MES	0,02	0,06	0,06	0,11	0,20	0,25	0,34	0,37	0,38	0,38	0,38	322
	6-12MES	0,01	0,04	0,05	0,10	0,17	0,20	0,40	0,41	0,41	0,41	0,41	164
	>12MES	0,03	0,05	0,06	0,12	0,22	0,26	0,33	0,38	0,44	0,44	0,44	329
C16	1SEM	0,86	1,17	1,36	2,31	3,79	4,31	5,42	5,93	7,14	7,73	8,98	92711
	2SEM	0,48	0,67	0,80	1,44	2,62	3,10	4,28	4,81	5,92	6,61	7,16	11402
	3SEM	0,25	0,37	0,45	0,79	1,53	1,93	3,28	3,80	5,02	5,70	6,76	3962
	4SEM	0,18	0,28	0,34	0,57	1,25	1,89	3,61	3,84	5,66	6,04		1247
	1-3MES	0,21	0,29	0,36	0,70	1,62	2,26	3,58	4,02	5,54	5,55		1827
	3-6MES	0,12	0,45	0,53	0,92	1,76	2,51	4,16	5,59	6,48	6,48		322
	6-12MES	0,06	0,38	0,46	0,82	1,41	1,76	4,09	5,37	5,37	5,37		164
	>12MES	0,09	0,39	0,48	0,92	2,59	2,98	3,80	4,18	4,79	4,79		329
C4DC	1SEM	0,06	0,09	0,10	0,17	0,28	0,32	0,42	0,46	0,57	0,63	0,88	92710
	2SEM	0,06	0,09	0,11	0,17	0,28	0,32	0,43	0,46	0,56	0,59	0,66	11402
	3SEM	0,06	0,08	0,10	0,17	0,29	0,33	0,45	0,51	0,67	0,90		3962
	4SEM	0,06	0,08	0,10	0,17	0,29	0,33	0,44	0,50	0,70			1247
	1-3MES	0,06	0,09	0,11	0,20	0,36	0,42	0,55	0,65	0,81	0,89		2074
	3-6MES	0,07	0,12	0,17	0,38	0,59	0,68	0,96	1,00				322
	6-12MES	0,05	0,13	0,19	0,41	0,65	0,79	1,03					164
	>12MES	0,07	0,12	0,14	0,36	0,67	0,77	0,97	1,00				328
C6DC	1SEM	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13	0,17	0,19	0,30	92534
	2SEM	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,12	0,13	0,20	0,22	0,91	11371
	3SEM	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,09	0,13	0,14	0,23	0,35		3945
	4SEM	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,09	0,11	0,13	0,21			1237
	1-3MES	0,01	0,01	0,01	0,03	0,07	0,08	0,11	0,13	0,16	0,16		2058
	3-6MES	0,01	0,01	0,02	0,04	0,08	0,09	0,15	0,17				321
	6-12MES	0,01	0,01	0,01	0,03	0,08	0,10	0,15					164
	>12MES	0,01	0,01	0,01	0,03	0,07	0,08	0,11	0,14				326

Tabla 57.f Distribución de diferentes marcadores (μmol/L) según la edad a la toma de muestra.

		POBLACION NORMAL (según edad a la toma de muestra)											
		Percentiles											
Analito	Edad TM	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C18:2	1SEM	0,05	0,08	0,10	0,20	0,36	0,42	0,54	0,60	0,74	0,83	1,07	92695
	2SEM	0,05	0,09	0,11	0,19	0,34	0,40	0,54	0,62	0,81	1,03	1,57	11401
	3SEM	0,04	0,06	0,08	0,15	0,27	0,33	0,43	0,52	0,68	0,79	0,99	3960
	4SEM	0,03	0,05	0,06	0,12	0,24	0,29	0,44	0,45	0,73	0,75	0,75	1245
	2-3MES	0,03	0,06	0,08	0,17	0,35	0,42	0,60	0,66	0,86	0,93	0,93	1826
	3-6MES	0,04	0,10	0,13	0,24	0,41	0,49	0,91	1,33	1,51	1,51	1,51	322
	>6MES	0,03	0,08	0,10	0,19	0,34	0,38	0,50	0,53	0,59	0,59	0,59	493

Tabla 57.g Distribución de diferentes marcadores (μmol/L) según la edad a la toma de muestra.

*Parte experimental*

		POBLACION NORMAL (según edad a la toma de muestra)											
		Percentiles											
Analito	Edad TM	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C5:1	1SEM	0,01	0,01	0,01	0,04	0,09	0,11	0,18	0,22	0,35	0,43	0,67	90813
	2SEM	0,01	0,01	0,02	0,04	0,09	0,12	0,18	0,22	0,35	0,40	0,57	11285
	3SEM	0,01	0,01	0,02	0,04	0,09	0,11	0,18	0,24	0,48	0,53	0,90	3881
	4SEM	0,01	0,01	0,01	0,04	0,09	0,11	0,16	0,17	0,36	0,36		1213
	> 1MES	0,01	0,01	0,02	0,04	0,09	0,11	0,18	0,22	0,36	0,43	0,60	19204

Tabla 57.h Distribución de diferentes marcadores (μmol/L) según la edad a la toma de muestra.

		POBLACION NORMAL (según edad a la toma de muestra)											
		Percentiles											
Analito	Edad TM	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C0	1SEM	6,77	9,00	10,53	18,36	31,68	36,90	48,77	54,51	70,14	77,89	100,99	92710
	2SEM	6,59	8,82	10,23	17,18	28,67	33,22	45,84	51,39	64,80	72,11	120,36	11402
	3 - 4 SEM	6,39	9,01	10,48	17,76	29,68	34,57	45,01	51,41	62,18	83,57	141,16	5209
	1-3MES	6,64	9,92	11,74	20,98	36,87	43,99	60,65	66,84	83,96	102,27		1827
	3-6 MES	7,79	10,59	13,18	23,85	41,85	49,13	65,27	67,10	68,17	68,17		322
	> 6MES	5,94	9,12	11,63	20,35	35,50	39,61	54,41	61,63	72,28	72,28		493

Tabla 57.i Distribución de diferentes marcadores (μmol/L) según la edad a la toma de muestra.

		POBLACION NORMAL (según edad a la toma de muestra)											
		Percentiles											
Analito	Edad TM	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C3	1SEM	0,36	0,52	0,64	1,34	2,57	3,06	4,21	4,71	6,03	6,84	8,94	92710
	2SEM	0,24	0,34	0,40	0,73	1,38	1,67	2,59	3,10	4,46	5,34	7,87	11402
	3 - 4 SEM	0,21	0,31	0,37	0,71	1,32	1,60	2,39	3,04	4,55	5,46	8,19	5209
	> 1MES	0,23	0,33	0,40	0,76	1,53	1,97	3,10	3,63	5,42	5,90	8,74	19500
C5DC	1SEM	0,01	0,02	0,02	0,04	0,08	0,10	0,15	0,18	0,23	0,25	0,50	92032
	2SEM	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,12	0,13	0,20	0,22	0,91	11371
	3 - 4 SEM	0,01	0,01	0,02	0,04	0,08	0,09	0,16	0,18	0,23	0,39	1,19	5209
	> 1MES	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,12	0,13	0,19	0,22	0,63	19422
C5OH	1SEM	0,06	0,08	0,09	0,13	0,20	0,23	0,31	0,35	0,50	0,59	0,93	92711
	2SEM	0,06	0,08	0,09	0,14	0,20	0,23	0,30	0,34	0,53	0,65	1,23	11402
	3 - 4 SEM	0,06	0,08	0,09	0,14	0,22	0,25	0,34	0,40	1,05	2,00	3,22	5209
	1-6MES	0,05	0,07	0,08	0,13	0,21	0,24	0,33	0,43	0,63	0,84	0,86	2149
	6-12MES	0,03	0,07	0,09	0,14	0,24	0,29	0,59	0,96	0,96	0,96	0,96	164
	>12MES	0,05	0,09	0,10	0,17	0,31	0,36	0,68	1,15	1,58	1,58	1,58	329
C14OH	1SEM	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,14	91414
	2SEM	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,66	11280
	3 - 4 SEM	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,07	0,08	0,10	0,11		5062
	> 1MES	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,27	19161

Tabla 57.j Distribución de diferentes marcadores (μmol/L) según la edad a la toma de muestra.



*Parte experimental*

		POBLACION NORMAL (según edad a la toma de muestra)											
		Percentiles											
Analito	Edad TM	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C8/C2	1SEM	0,001	0,001	0,002	0,004	0,006	0,007	0,010	0,012	0,016	0,019	0,052	92565
	2SEM	0,001	0,002	0,003	0,005	0,009	0,010	0,015	0,017	0,029	0,036	0,230	11395
	3SEM	0,001	0,002	0,003	0,006	0,010	0,012	0,017	0,020	0,038	0,048		3956
	4SEM	0,001	0,002	0,003	0,006	0,011	0,013	0,020	0,024	0,061			1246
	2-3MES	0,001	0,002	0,002	0,005	0,010	0,013	0,019	0,022	0,030	0,040		2073
	3-6MES	0,001	0,002	0,003	0,005	0,010	0,014	0,021	0,025				321
	6-12MES	0,000	0,002	0,002	0,005	0,010	0,013	0,052					164
	>12MES	0,001	0,002	0,003	0,006	0,011	0,013	0,023	0,028				329
C3/C2	1SEM	0,026	0,035	0,041	0,070	0,118	0,137	0,183	0,203	0,249	0,269	0,349	92708
	2SEM	0,020	0,028	0,033	0,057	0,096	0,111	0,153	0,177	0,226	0,258	0,476	11402
	3SEM	0,020	0,028	0,034	0,061	0,108	0,126	0,172	0,191	0,278	0,361		3962
	4SEM	0,022	0,030	0,036	0,066	0,121	0,141	0,195	0,220	0,310			1247
	2-3MES	0,027	0,036	0,043	0,085	0,150	0,176	0,241	0,266	0,358	0,381		2074
	3-6MES	0,027	0,042	0,048	0,085	0,155	0,178	0,257	0,374				322
	6-12MES	0,038	0,043	0,048	0,092	0,157	0,201	0,321					164
	>12MES	0,031	0,043	0,052	0,099	0,168	0,190	0,283	0,330				329
C4/C2	1SEM	0,005	0,007	0,008	0,014	0,024	0,028	0,037	0,041	0,054	0,064	0,105	92708
	2SEM	0,006	0,009	0,011	0,018	0,029	0,033	0,046	0,051	0,066	0,097	0,253	11402
	3SEM	0,006	0,009	0,011	0,019	0,031	0,037	0,051	0,064	0,083	0,087		3962
	4SEM	0,006	0,009	0,011	0,020	0,033	0,039	0,058	0,070	0,118			1247
	2-3MES	0,005	0,008	0,009	0,018	0,032	0,038	0,053	0,063	0,098	0,118		2074
	3-6MES	0,006	0,008	0,009	0,016	0,031	0,037	0,046	0,048				322
	6-12MES	0,004	0,009	0,011	0,020	0,035	0,045	0,166					164
	>12MES	0,006	0,009	0,011	0,018	0,032	0,039	0,072	0,118				329
C5/C2	1SEM	0,002	0,003	0,004	0,008	0,017	0,023	0,049	0,060	0,099	0,118	0,218	92678
	2SEM	0,003	0,005	0,007	0,013	0,027	0,039	0,092	0,127	0,247	0,288	0,762	11394
	3SEM	0,005	0,007	0,008	0,016	0,028	0,035	0,068	0,125	0,233	0,380		3959
	4SEM	0,004	0,006	0,008	0,016	0,030	0,036	0,059	0,064	0,409			1244
	2-3MES	0,003	0,005	0,006	0,013	0,027	0,033	0,052	0,063	0,104	0,192		2068
	3-6MES	0,002	0,003	0,005	0,010	0,019	0,024	0,036	0,042				322
	6-12MES	0,002	0,004	0,004	0,010	0,026	0,030	0,135					164
	>12MES	0,003	0,004	0,005	0,009	0,019	0,023	0,040	0,045				329
C3DC/C4OH	1SEM	0,041	0,079	0,108	0,255	0,500	0,625	0,875	1,000	1,400	1,611	2,735	91843
	2SEM	0,051	0,109	0,148	0,333	0,625	0,750	1,000	1,200	2,000	2,337	7,430	11321
	3SEM	0,049	0,098	0,137	0,344	0,700	0,851	1,250	1,470	2,003	2,696		3903
	4SEM	0,054	0,105	0,153	0,378	0,750	0,871	1,274	1,724	2,595			1231
	2-3MES	0,048	0,109	0,149	0,374	0,750	0,934	1,392	1,664	2,509	2,607		2034
	3-6MES	0,069	0,115	0,142	0,342	0,700	0,800	1,185	1,528				317
	6-12MES	0,064	0,130	0,167	0,362	0,701	0,886	1,665					161
	>12MES	0,048	0,119	0,144	0,348	0,809	1,018	2,537	3,275				329
C3/C16	1SEM	0,183	0,259	0,311	0,576	1,028	1,206	1,643	1,870	2,497	2,770	3,726	92029
	2SEM	0,155	0,220	0,265	0,511	0,983	1,186	1,692	1,993	2,993	3,218	5,718	11316
	3SEM	0,225	0,352	0,430	0,889	1,682	2,006	2,865	3,222	6,002	7,209		3918
	4SEM	0,287	0,450	0,570	1,188	2,233	2,637	3,733	4,339	40,564			1236
	2-3MES	0,258	0,457	0,647	1,556	2,914	3,449	4,585	5,159	8,036	13,876		2041
	3-6MES	0,260	0,413	0,553	1,436	2,717	3,205	5,056	5,403				320
	6-12MES	0,300	0,578	0,764	1,500	3,134	3,427	4,987					164
	>12MES	0,212	0,400	0,516	1,509	2,883	3,234	5,317	7,911				327

**Tabla 58.a Distribución de las ratios de diferentes marcadores diagnósticos según la edad a la toma de muestra.**

*Parte experimental*

POBLACION NORMAL (según edad a la toma de muestra)													
Percentiles													
Analito	Edad TM	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C4/C3	1SEM	0,052	0,075	0,093	0,206	0,425	0,511	0,714	0,806	1,040	1,208	1,571	92709
	2SEM	0,081	0,129	0,164	0,331	0,612	0,728	1,000	1,131	1,486	1,667	3,082	11402
	3SEM	0,083	0,117	0,144	0,310	0,627	0,767	1,138	1,302	1,653	1,892		3959
	4SEM	0,074	0,107	0,137	0,301	0,644	0,773	1,352	1,667	2,509			1247
	2-3MES	0,049	0,070	0,089	0,206	0,494	0,606	0,983	1,215	1,647	1,702		2070
	3-6MES	0,052	0,074	0,092	0,190	0,426	0,512	0,929	1,039				322
	6-12MES	0,054	0,094	0,113	0,217	0,451	0,558	1,078					164
	>12MES	0,056	0,080	0,095	0,197	0,406	0,501	0,733	1,024				329
C4/C8	1SEM	1,219	1,813	2,182	4,047	7,921	9,997	17,164	22,137	38,295	47,238	71,135	92568
	2SEM	1,225	1,763	2,122	3,800	6,800	8,500	13,888	17,000	27,699	34,297	54,375	11392
	3SEM	1,035	1,534	1,820	3,333	6,750	8,950	16,258	21,235	38,222	46,551		3953
	4SEM	0,936	1,504	1,794	3,280	6,764	9,353	18,858	25,713	42,021			1246
	2-3MES	1,034	1,446	1,714	3,400	7,013	9,009	14,514	19,907	30,672	37,489		2071
	3-6MES	0,872	1,406	1,708	3,250	6,602	9,059	13,867	21,004				322
	6-12MES	0,881	1,507	1,907	3,731	7,938	10,418	21,336					163
	>12MES	0,826	1,334	1,606	3,404	6,985	9,061	20,227	55,703				328
C5/C0	1SEM	0,002	0,003	0,004	0,008	0,017	0,025	0,053	0,067	0,102	0,122	0,182	92568
	2SEM	0,003	0,004	0,005	0,010	0,022	0,031	0,070	0,092	0,160	0,203	0,287	11392
	3SEM	0,003	0,004	0,005	0,010	0,021	0,028	0,052	0,068	0,185	0,208		3953
	4SEM	0,003	0,004	0,005	0,009	0,020	0,026	0,041	0,052	0,109			1246
	2-3MES	0,002	0,003	0,004	0,007	0,017	0,022	0,042	0,048	0,076	0,217		2071
	3-6MES	0,002	0,002	0,003	0,006	0,013	0,016	0,033	0,044				322
	6-12MES	0,002	0,003	0,003	0,006	0,016	0,021	0,129					163
	>12MES	0,002	0,002	0,003	0,006	0,014	0,018	0,039	0,072				328
C5/C3	1SEM	0,025	0,037	0,046	0,107	0,280	0,378	0,738	0,957	1,500	1,806	2,864	92569
	2SEM	0,044	0,082	0,110	0,231	0,519	0,751	1,667	2,207	4,476	5,144	10,955	11392
	3SEM	0,058	0,105	0,125	0,256	0,530	0,664	1,281	2,309	5,716	9,451		3953
	4SEM	0,045	0,081	0,112	0,244	0,505	0,606	0,888	1,449	3,264			1246
	2-3MES	0,032	0,051	0,061	0,159	0,375	0,477	0,763	0,884	2,230	2,298		2071
	3-6MES	0,025	0,039	0,053	0,106	0,255	0,373	0,625	0,971				322
	6-12MES	0,030	0,045	0,052	0,109	0,252	0,365	0,766					163
	>12MES	0,026	0,042	0,050	0,095	0,193	0,254	0,506	0,619				328
C5OH/C8	1SEM	0,654	0,950	1,125	2,000	3,821	4,900	8,892	11,939	21,920	27,580	54,298	92569
	2SEM	0,727	1,059	1,231	2,056	3,750	4,667	7,722	10,501	18,064	22,544	26,492	11392
	3SEM	0,730	1,062	1,247	2,172	4,333	5,592	9,633	13,355	23,376	25,709		3953
	4SEM	0,659	1,000	1,218	2,111	4,333	5,774	12,000	16,074	43,272			1246
	2-3MES	0,596	0,889	1,091	2,000	4,000	5,252	10,034	13,590	25,752	37,590		2071
	3-6MES	0,488	0,776	0,917	1,868	3,580	4,458	9,835	10,566				322
	6-12MES	0,564	0,760	0,893	1,926	4,078	6,883	22,699					163
	>12MES	0,471	0,834	1,105	2,145	5,210	7,835	29,639	168,440				328
C8/C10	1SEM	0,171	0,302	0,375	0,638	1,060	1,250	1,854	2,249	3,543	4,609	9,050	92679
	2SEM	0,222	0,349	0,417	0,687	1,143	1,333	2,000	2,333	4,425	5,010	27,008	11394
	3SEM	0,187	0,333	0,414	0,727	1,250	1,500	2,635	3,504	7,004	8,819		3959
	4SEM	0,185	0,334	0,415	0,750	1,308	1,665	2,661	3,551	8,004			1244
	2-3MES	0,165	0,333	0,422	0,750	1,286	1,572	2,491	2,994	4,820	13,362		2068
	3-6MES	0,229	0,341	0,429	0,667	1,140	1,370	2,224	2,551				322
	6-12MES	0,043	0,316	0,400	0,673	1,182	1,482	2,487					164
	>12MES	0,179	0,318	0,386	0,630	1,119	1,334	2,341	4,082				329
C3DC/C10	1SEM	0,073	0,140	0,182	0,375	0,672	0,825	1,233	1,500	2,496	3,048	7,129	91824
	2SEM	0,086	0,167	0,211	0,400	0,700	0,833	1,250	1,500	2,439	3,560	12,190	11313
	3SEM	0,075	0,143	0,190	0,406	0,778	1,000	1,500	2,000	3,413	4,936		3904
	4SEM	0,074	0,147	0,200	0,408	0,778	1,000	1,540	2,040	5,386			1229
	2-3MES	0,071	0,137	0,185	0,402	0,795	1,000	1,500	1,891	4,092	11,554		2029
	3-6MES	0,069	0,143	0,181	0,364	0,675	0,829	1,357	1,974				317
	6-12MES	0,083	0,168	0,212	0,385	0,769	0,933	2,231					161
	>12MES	0,063	0,124	0,175	0,367	0,667	0,828	1,704	2,709				329

**Tabla 58.b Distribución de las ratios de diferentes marcadores diagnósticos según la edad a la toma de muestra.**

*Parte experimental*

POBLACION NORMAL (según edad a la toma de muestra)													
Percentiles													
Analito	Edad TM	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C5DC/C5OH	1SEM	0,056	0,115	0,155	0,333	0,644	0,800	1,364	1,667	2,366	2,714	3,781	91905
	2SEM	0,063	0,118	0,159	0,333	0,583	0,714	1,374	1,750	2,537	2,714	3,540	11308
	3SEM	0,045	0,090	0,126	0,294	0,556	0,688	1,200	1,524	2,274	2,756		3913
	4SEM	0,043	0,090	0,123	0,304	0,583	0,716	1,475	1,886	2,681			1235
	2-3MES	0,046	0,092	0,122	0,302	0,615	0,727	1,499	1,754	2,096	2,981		2042
	3-6MES	0,048	0,087	0,121	0,304	0,667	0,802	1,275	1,510				320
	6-12MES	0,017	0,070	0,107	0,296	0,634	0,818	1,967					163
	>12MES	0,033	0,075	0,102	0,267	0,595	0,812	1,933	4,510				326
C5DC/C8	1SEM	0,143	0,272	0,345	0,667	1,250	1,569	2,667	3,333	5,755	7,030	11,358	91905
	2SEM	0,156	0,286	0,364	0,667	1,200	1,500	2,623	3,167	5,000	6,251	7,000	11308
	3SEM	0,120	0,231	0,313	0,647	1,205	1,515	2,745	3,500	5,004	7,135		3913
	4SEM	0,122	0,222	0,302	0,667	1,205	1,500	2,992	4,320	7,451			1235
	2-3MES	0,110	0,200	0,276	0,603	1,176	1,539	2,667	3,352	7,320	11,117		2042
	3-6MES	0,122	0,203	0,279	0,571	1,108	1,250	1,832	2,592				320
	6-12MES	0,060	0,159	0,250	0,556	1,000	1,250	4,751					163
	>12MES	0,166	0,238	0,302	0,588	1,209	1,642	2,865	3,698				326
C5DC/C16	1SEM	0,003	0,007	0,009	0,019	0,039	0,049	0,077	0,094	0,147	0,171	0,397	91926
	2SEM	0,005	0,010	0,013	0,029	0,065	0,085	0,138	0,165	0,259	0,318	3,941	11284
	3SEM	0,006	0,013	0,019	0,051	0,111	0,148	0,258	0,330	0,500	0,550		3900
	4SEM	0,009	0,016	0,022	0,069	0,151	0,194	0,318	0,364	4,965			1220
	2-3MES	0,007	0,012	0,017	0,055	0,139	0,178	0,278	0,346	0,995	1,989		2022
	3-6MES	0,004	0,013	0,018	0,043	0,109	0,145	0,459	0,720				319
	6-12MES	0,004	0,010	0,016	0,050	0,111	0,143	1,236					164
	>12MES	0,007	0,014	0,018	0,046	0,118	0,129	0,659	3,771				324
C14:1/C12:1	1SEM	0,980	1,312	1,500	2,667	5,000	6,422	10,555	13,289	23,417	30,130	51,830	91926
	2SEM	0,857	1,172	1,429	2,500	5,000	6,233	10,702	13,519	26,275	31,567	93,759	11284
	3SEM	0,667	1,000	1,257	2,379	5,000	6,799	12,563	15,623	35,106	38,000		3900
	4SEM	0,557	1,000	1,070	2,000	4,850	6,000	12,161	14,662	31,431			1220
	2-3MES	0,593	1,000	1,250	2,379	5,500	7,000	13,470	17,645	36,701	37,989		2022
	3-6MES	0,773	1,173	1,333	2,500	5,530	7,598	16,433	19,324				319
	6-12MES	0,331	1,000	1,240	2,500	5,000	6,366	17,721					164
	>12MES	0,444	1,000	1,230	2,157	4,308	5,325	8,878	16,219				324
C14:1/C16	1SEM	0,014	0,019	0,023	0,041	0,085	0,103	0,151	0,180	0,265	0,318	0,425	92076
	2SEM	0,014	0,019	0,023	0,042	0,089	0,115	0,181	0,213	0,339	0,424	0,662	11323
	3SEM	0,019	0,028	0,035	0,067	0,139	0,171	0,257	0,303	0,532	0,701		3885
	4SEM	0,018	0,031	0,039	0,080	0,158	0,194	0,319	0,384	3,220			1219
	2-3MES	0,019	0,029	0,036	0,078	0,167	0,213	0,336	0,459	0,730	0,842		2016
	3-6MES	0,019	0,029	0,035	0,073	0,176	0,227	0,391	0,406				316
	6-12MES	0,019	0,033	0,041	0,080	0,185	0,229	0,326					162
	>12MES	0,018	0,029	0,033	0,088	0,217	0,269	0,496	0,940				319
C16OH/C16	1SEM	0,002	0,004	0,004	0,009	0,017	0,021	0,032	0,038	0,057	0,072	0,200	92076
	2SEM	0,003	0,005	0,006	0,013	0,026	0,034	0,057	0,069	0,100	0,135	1,033	11323
	3SEM	0,003	0,006	0,008	0,021	0,047	0,062	0,104	0,124	0,169	0,268		3885
	4SEM	0,004	0,007	0,009	0,026	0,063	0,075	0,134	0,172	0,438			1219
	2-3MES	0,003	0,006	0,008	0,022	0,054	0,069	0,121	0,167	0,331	0,417		2016
	3-6MES	0,003	0,006	0,008	0,020	0,045	0,056	0,136	0,294				316
	6-12MES	0,003	0,006	0,009	0,021	0,050	0,070	0,229					162
	>12MES	0,003	0,005	0,007	0,016	0,038	0,053	0,126	0,586				319

**Tabla 58.c Distribución de las ratios de diferentes marcadores diagnósticos según la edad a la toma de muestra.**

## Parte experimental

### 5.7. Influencia de la ingesta de alimentación artificial suplementada con carnitina sobre las AC en sangre

Para valorar el efecto de que C0 sea muy elevada, se calcularon asimismo los percentiles de la población neonatal normal entre 1500 y 4100 g de peso y en la primera semana de vida, eliminando los casos cuya C0 era superior al p99 de C0, es decir  $C0 > 48,77 \mu\text{M}$  (Tabla 59).

POBLACION NORMAL (< 8d, entre 1500 y 4100 g peso al nacimiento)*												
Percentiles												
Analito	1%	5%	10%	50%	90%	95%	0,99	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C0	6,73	8,94	10,46	18,20	30,91	35,50	43,69	45,90	48,11	48,44	48,72	87257
C2	7,85	10,01	11,44	18,50	30,45	34,87	44,73	49,02	59,56	64,69	76,76	87255
C3	0,36	0,51	0,63	1,32	2,53	2,99	4,10	4,55	5,74	6,25	8,19	87256
C4	0,09	0,13	0,16	0,27	0,45	0,52	0,68	0,75	0,94	1,03	1,36	87256
C4OH	0,05	0,07	0,08	0,15	0,29	0,36	0,51	0,60	0,89	1,21	2,96	87249
C5	0,05	0,07	0,08	0,14	0,26	0,39	0,80	0,94	1,30	1,48	2,03	87256
C5:1	0,01	0,01	0,01	0,04	0,09	0,11	0,18	0,23	0,35	0,43	0,67	85493
C5OH	0,06	0,08	0,09	0,13	0,20	0,23	0,30	0,34	0,50	0,59	0,91	87257
C6	0,02	0,04	0,05	0,09	0,17	0,21	0,29	0,32	0,40	0,43	0,64	87127
C8:1	0,02	0,03	0,04	0,08	0,14	0,16	0,21	0,23	0,28	0,31	0,47	87152
C8	0,02	0,03	0,04	0,07	0,11	0,13	0,17	0,19	0,26	0,29	0,52	87255
C10:1	0,02	0,04	0,04	0,08	0,13	0,15	0,19	0,22	0,28	0,33	0,47	87164
C10	0,03	0,05	0,06	0,10	0,17	0,20	0,29	0,33	0,44	0,50	0,75	87232
C3DC	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,12	0,13	0,18	0,21	0,29	86466
C4DC	0,06	0,09	0,10	0,17	0,28	0,32	0,42	0,46	0,56	0,62	0,84	87256
C5DC	0,01	0,02	0,02	0,04	0,08	0,10	0,16	0,18	0,23	0,25	0,47	86625
C6DC	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13	0,17	0,18	0,30	87091
C12	0,05	0,06	0,07	0,15	0,37	0,47	0,72	0,85	1,21	1,39	1,86	87256
C14:2	0,01	0,01	0,01	0,03	0,05	0,06	0,09	0,11	0,14	0,16	0,25	86962
C14:1	0,03	0,04	0,05	0,09	0,22	0,27	0,39	0,46	0,64	0,74	0,96	87257
C14	0,07	0,09	0,10	0,17	0,30	0,35	0,45	0,50	0,61	0,66	0,76	87257
C16	0,87	1,17	1,36	2,30	3,75	4,25	5,33	5,77	6,91	7,43	8,59	87257
C18:2	0,05	0,08	0,10	0,20	0,35	0,41	0,53	0,58	0,71	0,76	1,01	87241
C18:1	0,63	0,82	0,92	1,41	2,09	2,33	2,87	3,08	3,59	3,85	4,63	87255
C18	0,33	0,43	0,50	0,79	1,23	1,39	1,73	1,87	2,21	2,37	2,77	87254
C14OH	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,15	86046
C16OH	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,07	0,08	0,12	0,14	0,20	86665
C16-1OH	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,15	0,16	0,20	87065
C18-1OH	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,08	0,09	0,13	0,15	0,22	86777
C18-OH	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,06	0,07	0,10	0,12	0,17	85534

Tabla 59. Percentiles de la población neonatal normal en la primera semana de vida, con pesos entre 1500 y 4100 g (\*se han eliminado los casos en que  $C0 > p99$ ).

**5.8. Influencia de la edad gestacional sobre los niveles de AC en sangre, en la primera semana de vida**

La edad gestacional (EG) es un indicador que suele manejarse poco fuera de los ámbitos médicos y ello hace que en muchas ocasiones no sea conocido fuera del ámbito donde se ha producido el parto. En consonancia con lo anterior, esta información solamente estuvo disponible en entre un 30 y un 40% de las muestras analizadas.

Puesto que la EG aporta información suplementaria a la posible presencia de alteraciones durante el embarazo, se ha tratado de realizar un estudio de los niveles de AC en sangre de acuerdo con la clasificación habitual de menor de 38 semanas, entre 38 y 42 y mayor de 42 semanas.

En las tablas siguientes se presentan los percentiles de las diferentes AC para la población neonatal normal menor de 8 días de vida, en función de la edad gestacional (Tabla 60 a-b).

*Parte experimental*

POBLACION NORMAL (<8d, según edad gestacional)													
Percentiles													
Analito	Edad Gestac	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C0	<38	9,01	11,91	13,68	22,88	38,51	44,38	58,27	65,93	90,24	103,03		4005
	38-42	8,93	11,87	13,65	22,63	36,63	41,88	54,67	60,10	74,29	81,37	98,01	23316
	>42	6,58	10,45	12,08	20,25	34,85	43,44						55
C2	<38	7,72	10,31	12,09	19,83	31,81	36,70	48,71	56,52	73,58	77,53		4005
	38-42	7,98	10,43	11,95	19,49	31,22	35,78	46,49	50,95	64,30	69,97	85,36	23316
	>42	8,82	9,84	11,21	17,70	29,79	34,08						55
C3	<38	0,58	0,85	1,04	1,85	3,20	3,70	4,97	5,52	7,66	7,90		4005
	38-42	0,63	0,85	1,00	1,73	2,96	3,46	4,60	5,04	6,35	7,02	9,93	23317
	>42	0,74	0,85	0,97	1,53	2,95	3,13						55
C4	<38	0,09	0,12	0,15	0,26	0,45	0,54	0,72	0,82	1,19	1,24		4005
	38-42	0,08	0,11	0,13	0,24	0,41	0,49	0,65	0,73	0,95	1,11	1,39	23317
	>42	0,08	0,09	0,12	0,23	0,45	0,50						55
C4OH	<38	0,05	0,08	0,09	0,17	0,32	0,39	0,55	0,61	0,85	1,30		3950
	38-42	0,05	0,08	0,09	0,18	0,34	0,41	0,60	0,71	1,19	1,76	4,51	23014
	>42	0,08	0,08	0,10	0,18	0,30	0,43						55
C5	<38	0,05	0,07	0,08	0,15	0,47	0,72	1,10	1,30	1,86	2,24		4005
	38-42	0,04	0,06	0,07	0,12	0,21	0,27	0,69	0,85	1,20	1,38	1,85	23317
	>42	0,02	0,05	0,07	0,11	0,19	0,22						55
C5:1	<38	0,00	0,01	0,01	0,03	0,05	0,06	0,08	0,09	0,13	0,15		3221
	38-42	0,00	0,01	0,01	0,03	0,04	0,05	0,07	0,08	0,12	0,13	0,19	18769
	>42	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05						47
C5OH	<38	0,06	0,08	0,09	0,14	0,22	0,25	0,35	0,42	0,59	0,86		3993
	38-42	0,05	0,07	0,09	0,14	0,21	0,25	0,34	0,40	0,58	0,68	0,91	23219
	>42	0,03	0,05	0,07	0,12	0,19	0,21						54
C6	<38	0,01	0,03	0,04	0,08	0,15	0,18	0,25	0,27	0,33	0,35		3993
	38-42	0,01	0,03	0,04	0,08	0,14	0,17	0,22	0,25	0,31	0,35	0,45	23219
	>42	0,02	0,03	0,04	0,08	0,17	0,18						54
C8:1	<38	0,02	0,03	0,04	0,09	0,16	0,18	0,24	0,26	0,34	0,37		3921
	38-42	0,01	0,03	0,04	0,08	0,14	0,16	0,21	0,23	0,28	0,30	0,37	22782
	>42	0,01	0,03	0,03	0,07	0,13	0,18						53
C8	<38	0,01	0,03	0,03	0,07	0,11	0,13	0,18	0,20	0,26	0,30		4005
	38-42	0,01	0,02	0,03	0,06	0,11	0,12	0,17	0,19	0,25	0,28	0,38	23316
	>42	0,02	0,02	0,03	0,06	0,10	0,10						55
C10:1	<38	0,02	0,03	0,04	0,08	0,13	0,15	0,20	0,22	0,28	0,31		3992
	38-42	0,02	0,03	0,04	0,07	0,12	0,14	0,19	0,21	0,26	0,28	0,40	23247
	>42	0,02	0,03	0,04	0,07	0,14	0,16						55
C10	<38	0,03	0,05	0,06	0,11	0,19	0,22	0,31	0,38	0,54	0,63		3992
	38-42	0,03	0,05	0,06	0,11	0,19	0,22	0,31	0,35	0,45	0,49	0,67	23247
	>42	0,02	0,05	0,06	0,12	0,17	0,30						55
C3DC	<38	0,01	0,01	0,02	0,04	0,06	0,07	0,10	0,11	0,13	0,17		3160
	38-42	0,01	0,01	0,02	0,04	0,06	0,07	0,10	0,11	0,13	0,14	0,18	18377
	>42	0,01	0,01	0,01	0,03	0,05	0,07						47
C4DC	<38	0,04	0,07	0,08	0,14	0,24	0,27	0,36	0,39	0,48	0,58		3936
	38-42	0,05	0,08	0,10	0,17	0,27	0,31	0,39	0,43	0,50	0,55	0,80	22877
	>42	0,05	0,09	0,10	0,16	0,30	0,34						51
C5DC	<38	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13	0,19	0,20		3936
	38-42	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,12	0,14	0,15	0,20	22877
	>42	0,00	0,02	0,02	0,03	0,06	0,07						51
C6DC	<38	0,01	0,01	0,02	0,03	0,06	0,07	0,10	0,11	0,16	0,17		3984
	38-42	0,01	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,11	0,12	0,16	0,18	0,27	23211
	>42	0,01	0,01	0,01	0,04	0,08	0,09						55

Tabla 60.a Distribución de diferentes marcadores ( $\mu\text{mol/L}$ ) en la población neonatal normal en función de la edad gestacional.

## Parte experimental

POBLACION NORMAL (<8d, según edad gestacional)													
Percentiles													
Analito	Edad Gestac	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C12	<38	0,08	0,11	0,14	0,27	0,52	0,63	0,90	1,07	1,53	1,93		3996
	38-42	0,08	0,12	0,14	0,27	0,53	0,65	0,94	1,10	1,60	1,81	2,19	23255
	>42	0,05	0,08	0,10	0,28	0,62	0,79						55
C14:2	<38	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13	0,20	0,21		3950
	38-42	0,01	0,01	0,01	0,03	0,06	0,07	0,10	0,11	0,16	0,18	0,24	23014
	>42	0,00	0,01	0,01	0,03	0,05	0,08						55
C14:1	<38	0,05	0,07	0,09	0,17	0,31	0,36	0,50	0,59	0,85	0,97		3973
	38-42	0,05	0,07	0,09	0,16	0,29	0,35	0,51	0,58	0,81	0,93	1,07	23081
	>42	0,04	0,06	0,08	0,16	0,27	0,37						54
C14	<38	0,09	0,12	0,15	0,25	0,39	0,44	0,55	0,60	0,86	0,97		4005
	38-42	0,09	0,13	0,15	0,24	0,37	0,42	0,53	0,58	0,69	0,75	0,85	23317
	>42	0,07	0,10	0,13	0,22	0,37	0,44						55
C16	<38	0,96	1,30	1,52	2,52	4,09	4,56	5,73	6,47	7,05	7,57		4005
	38-42	1,01	1,38	1,59	2,62	4,12	4,63	5,78	6,29	7,62	8,02	9,40	23316
	>42	0,97	1,03	1,24	2,33	4,17	4,49						55
C18:2	<38	0,05	0,08	0,10	0,21	0,40	0,46	0,65	0,72	0,93	1,05		4002
	38-42	0,04	0,07	0,09	0,19	0,34	0,40	0,53	0,58	0,71	0,77	1,12	23304
	>42	0,04	0,05	0,07	0,18	0,37	0,44						55
C18:1	<38	0,69	0,89	1,02	1,53	2,27	2,54	3,14	3,27	3,97	4,21		4002
	38-42	0,68	0,87	0,98	1,48	2,17	2,42	2,94	3,16	3,68	3,85	4,60	23304
	>42	0,67	0,78	0,80	1,43	2,05	2,53						55
C18	<38	0,36	0,49	0,56	0,88	1,34	1,51	1,85	1,99	2,22	2,31		3998
	38-42	0,37	0,48	0,55	0,87	1,32	1,48	1,83	1,96	2,34	2,50	2,93	23262
	>42	0,29	0,42	0,48	0,84	1,53	1,59						55
C14OH	<38	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,06	0,07	0,09	0,11		3880
	38-42	0,00	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,10	0,13	22588
	>42	0,00	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04						53
C16OH	<38	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,07	0,09	0,14	0,16		3918
	38-42	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,07	0,08	0,11	0,15	0,30	22855
	>42	0,00	0,00	0,01	0,02	0,04	0,06						55
C16-1OH	<38	0,01	0,02	0,02	0,04	0,06	0,07	0,09	0,10	0,14	0,16		3950
	38-42	0,01	0,02	0,02	0,04	0,06	0,07	0,10	0,11	0,14	0,15	0,18	23014
	>42	0,01	0,01	0,01	0,04	0,06	0,07						55
C18-1OH	<38	0,00	0,01	0,01	0,03	0,05	0,06	0,09	0,10	0,16	0,19		3923
	38-42	0,00	0,01	0,01	0,03	0,05	0,06	0,09	0,11	0,15	0,17	0,28	22934
	>42	0,01	0,01	0,01	0,03	0,05	0,06						55
C18-OH	<38	0,00	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,05	0,06	0,08	0,10		3324
	38-42	0,00	0,00	0,01	0,01	0,03	0,03	0,04	0,05	0,07	0,08	0,13	19366
	>42	0,00	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03						44

**Tabla 60.b Distribución de diferentes marcadores (μmol/L) en la población neonatal normal en función de la edad gestacional.**

Se ha intentado realizar una clasificación combinando EG y peso para conocer los niveles de AC en sangre en función de la presencia o no de retraso del crecimiento intrauterino. Sin embargo, el número de casos no ha permitido completar el citado estudio.

Dentro del grupo de neonatos a término (considerados como tales los nacidos entre 38 y 42 semanas de gestación), se compararon los valores de las diferentes carnitinas, analizadas en la primera semana de vida, en función del peso al nacimiento. Este grupo lo constituyeron 788 neonatos de bajo peso (inferior o igual a 2500 g) y 22528 de peso superior a 2500 g. A pesar de que la gran diferencia en el tamaño muestral de ambos grupos puede enmascarar los resultados impidiendo observar diferencias aunque existan, se observaron diferencias estadísticamente significativas en las carnitinas que se presentan en la tabla siguiente.

*Parte experimental*

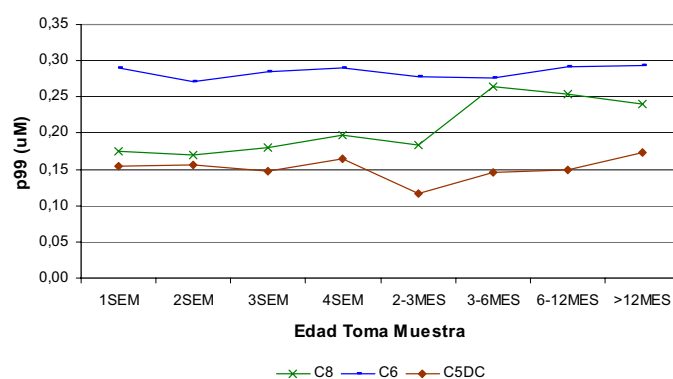
		POBLACION NORMAL (<8d, entre 38 y 42 SG, según Peso Nac)											
		Percentiles											
Analito	PesoNac (g)	1%	5%	10%	50%	90%	95%	99%	99.5%	99.9%	99.95%	99.99%	N
C0	≤2500	9,74	13,02	15,12	24,97	41,09	48,47	65,34	81,34				788
	>2500	8,90	11,84	13,61	22,56	36,49	41,69	54,32	59,64	73,36	79,71	98,80	22528
C2	≤2500	8,05	10,56	12,17	20,20	34,38	39,39	52,98	66,99				788
	>2500	7,97	10,43	11,94	19,47	31,12	35,68	46,21	50,72	63,71	68,18	85,97	22528
C4OH	≤2500	0,05	0,07	0,09	0,16	0,32	0,38	0,54	0,64				788
	>2500	0,05	0,08	0,09	0,18	0,34	0,41	0,60	0,71	1,18	1,77	4,58	22524
C4DC	≤2500	0,04	0,07	0,09	0,16	0,26	0,30	0,39	0,43				788
	>2500	0,05	0,08	0,10	0,17	0,27	0,31	0,39	0,43	0,50	0,55	0,81	22528
C5	≤2500	0,04	0,06	0,08	0,13	0,25	0,41	0,86	1,08				788
	>2500	0,04	0,06	0,07	0,12	0,21	0,27	0,68	0,85	1,19	1,39	1,86	22528
C8:1	≤2500	0,02	0,03	0,04	0,09	0,15	0,18	0,24	0,27				786
	>2500	0,01	0,03	0,03	0,07	0,13	0,16	0,21	0,23	0,28	0,30	0,37	22452
C8	≤2500	0,01	0,03	0,03	0,07	0,11	0,13	0,17	0,18				788
	>2500	0,01	0,02	0,03	0,06	0,11	0,12	0,17	0,19	0,25	0,28	0,38	22528
C10:1	≤2500	0,02	0,03	0,04	0,08	0,13	0,15	0,21	0,23				786
	>2500	0,02	0,03	0,04	0,07	0,12	0,14	0,19	0,21	0,26	0,28	0,40	22476
C14:2	≤2500	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13				784
	>2500	0,01	0,01	0,01	0,03	0,06	0,07	0,10	0,11	0,16	0,18	0,25	22361
C14:1	≤2500	0,05	0,08	0,09	0,17	0,32	0,38	0,54	0,59				788
	>2500	0,05	0,07	0,09	0,16	0,29	0,35	0,50	0,58	0,81	0,93	1,08	22528
C14-1OH	≤2500	0,01	0,01	0,01	0,03	0,05	0,05	0,09	0,09				787
	>2500	0,00	0,01	0,01	0,03	0,05	0,05	0,07	0,08	0,12	0,14	0,18	22293
C14	≤2500	0,09	0,12	0,15	0,24	0,39	0,44	0,55	0,63				788
	>2500	0,09	0,13	0,14	0,24	0,37	0,42	0,53	0,58	0,70	0,76	0,85	22528
C16:1	≤2500	0,04	0,06	0,08	0,15	0,28	0,31	0,42	0,56				788
	>2500	0,04	0,07	0,08	0,16	0,28	0,32	0,42	0,47	0,60	0,65	0,84	22521
C16OH	≤2500	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,04	0,06	0,08				774
	>2500	0,00	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,07	0,08	0,11	0,14	0,23	22202
C16	≤2500	0,85	1,29	1,53	2,47	4,05	4,52	5,63	6,02				788
	>2500	1,02	1,38	1,60	2,63	4,12	4,63	5,79	6,31	7,64	8,06	9,45	22528
C18:2	≤2500	0,06	0,08	0,11	0,23	0,44	0,50	0,67	0,73				788
	>2500	0,04	0,07	0,09	0,18	0,34	0,40	0,52	0,57	0,70	0,75	0,88	22516
C18:1	≤2500	0,69	0,91	1,04	1,54	2,34	2,70	3,25	3,42				788
	>2500	0,68	0,87	0,98	1,48	2,16	2,41	2,93	3,15	3,69	3,86	4,62	22528

**Tabla 61. Distribución de percentiles observados en las carnitinas que mostraron diferencias en función del peso al nacimiento, en un grupo de neonatos menores de 8 días de vida y nacidos entre las semanas 38 y 42 de gestación**

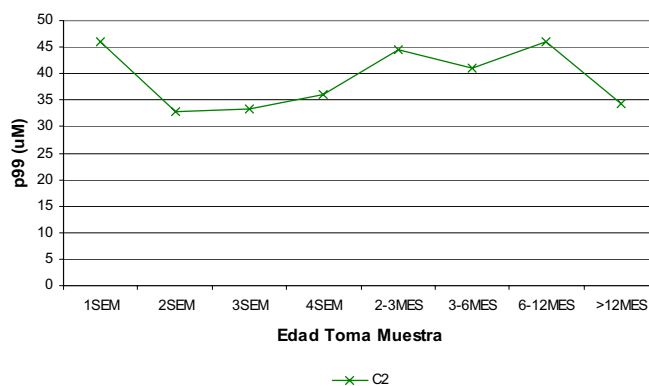


### 5.9. Gráficos de la evolución de algunos puntos de corte y AC en función de la edad

Con el fin de tener una visión más gráfica de cómo se comportan con la edad los puntos de corte utilizados habitualmente, en las Figura 42 a-e se representa el percentil 99 de diferentes AC en función de la edad a la toma de muestra.



**Figura 42.a** Evolución del percentil 99 de C8, C6 y C5DC ( $\mu\text{mol/L}$ ) en función de la edad a la toma de muestra.



**Figura 42.b** Evolución del percentil 99 de C2 ( $\mu\text{mol/L}$ ) en función de la edad a la toma de muestra.

## Parte experimental

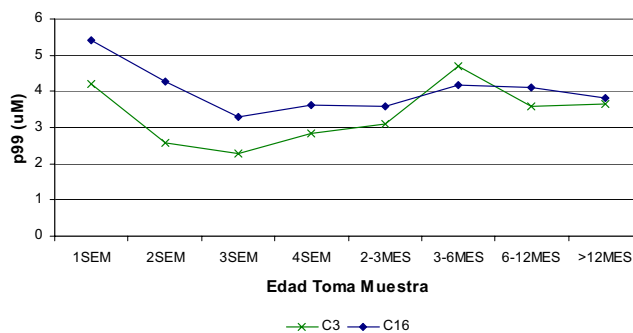


Figura 42.c Evolución del percentil 99 de C3 y C16 (μmol/L) en función de la edad a la toma de muestra.

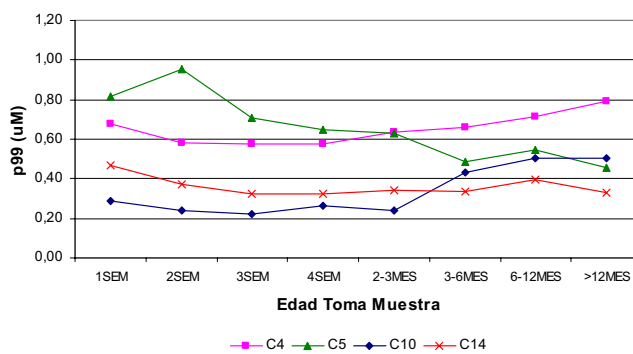


Figura 42.d Evolución del percentil 99 de C4, C5, C10 y C14 (μmol/L) en función de la edad a la toma de muestra.

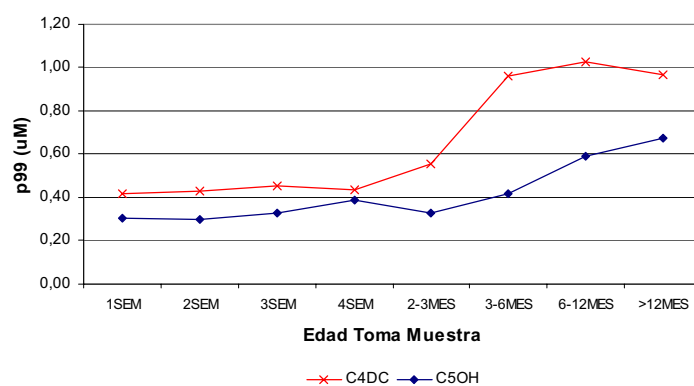
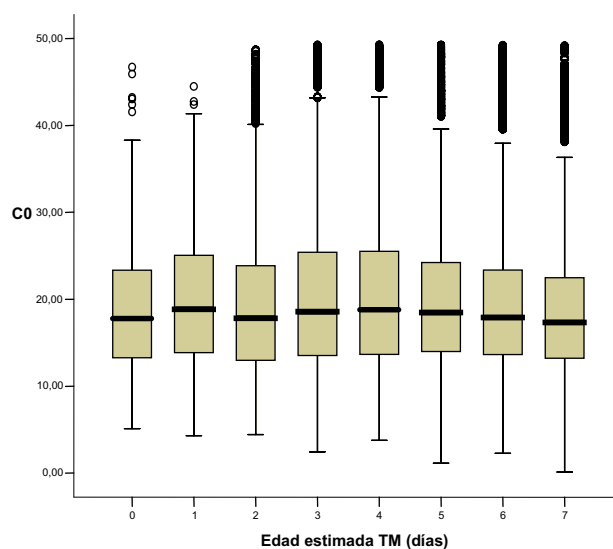


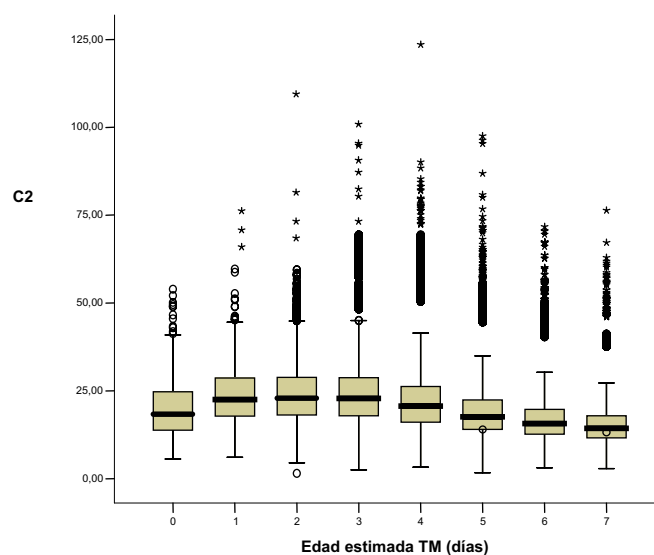
Figura 42.e Evolución del percentil 99 de C4DC y C5OH (μmol/L) en función de la edad a la toma de muestra.

## Parte experimental

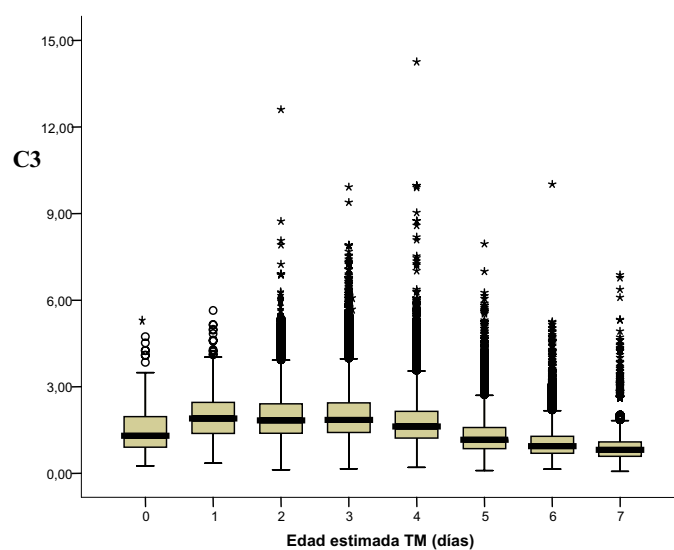
Con el fin de mostrar gráficamente la evolución de algunas de las principales AC, durante la primera semana de vida, se han construido varios diagramas de cajas “Boxplot” que aparecen recogidos en las Figura 43 a Figura 47.



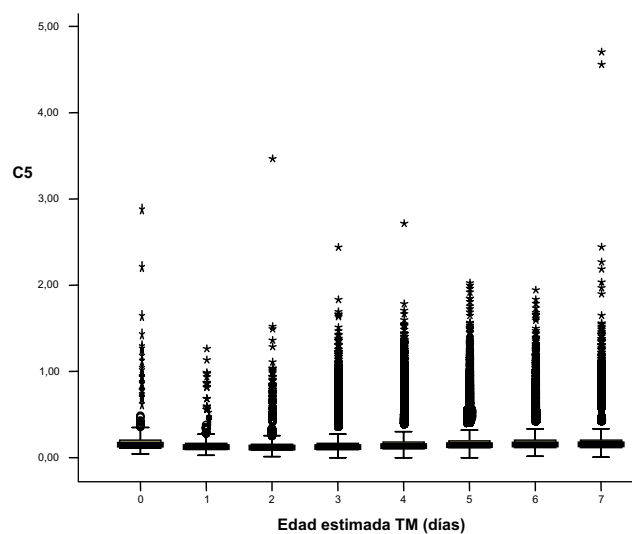
**Figura 43.** Diagrama de cajas de los valores de C0 ( $\mu\text{mol/L}$ ) en la población neonatal normal a lo largo de la primera semana de vida (eliminados resultados superiores al p99)(n=92710).



**Figura 44.** Diagrama de cajas de los valores de C2 ( $\mu\text{mol/L}$ ) en la población neonatal normal a lo largo de la primera semana de vida (n=92709).

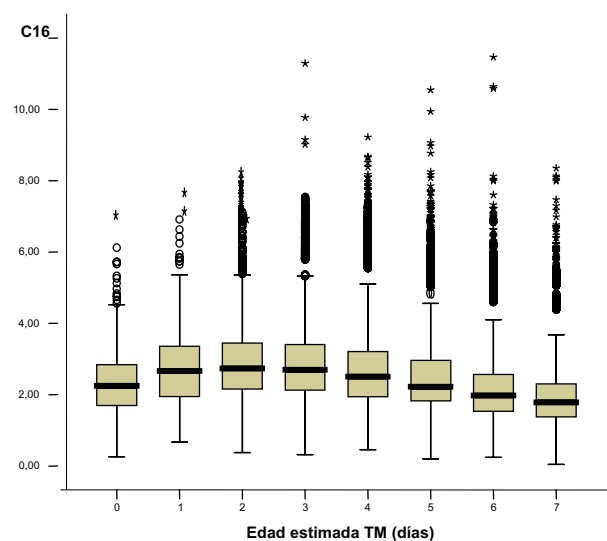


**Figura 45.** Diagrama de cajas de los valores de C3 ( $\mu\text{mol/L}$ ) en la población neonatal normal a lo largo de la primera semana de vida  $n=92710$ ).



**Figura 46.** Diagrama de cajas de los valores de C5 ( $\mu\text{mol/L}$ ) en la población neonatal normal a lo largo de la primera semana de vida ( $n=92710$ ).

## Parte experimental



**Figura 47. Diagrama de cajas de los valores de C16 ( $\mu\text{mol/L}$ ) en la población neonatal normal a lo largo de la primera semana de vida (n=92711).**

Las cajas comprenden en todos los casos el rango intercuartílico, p25 a p75, de forma que la marca de tendencia central se corresponde con la mediana (p50). Los valores aberrantes se representan con círculos, y se corresponden con datos que exceden entre 1.5 y 3 veces el rango intercuartílico. Se consideran valores extremos, representados con asteriscos, aquellos que exceden más de 3 veces dicho rango.

**5.10. Incidencia de las enfermedades del metabolismo de los ácidos orgánicos y carnitinas durante el periodo Jul 2000 - Dic 2005**

Desde el inicio del presente programa de cribado de metabolopatías, se efectuaron 30 diagnósticos, que se detallan en la Tabla 62. Diez de ellos correspondieron a errores de metabolismo de ácidos orgánicos y 20 a errores de metabolismo de carnitinas.

<b>Diagnóstico</b>	<b>Año de nacimiento</b>	<b>Sexo</b>	<b>Peso al nacimiento (g)</b>
Def CAR	2004	Mujer	3950
GA I	2001	Varón	3350
GA I	2001	Mujer	4200
HMG	2002	Varón	3700
LAC A Cong	2005	Mujer	2900
LCHAD	2000	Varón	2950
LCHAD	2003	Mujer	2100
LCHAD	2005	Mujer	3240
MCAD	2001	Varón	3000
MCAD	2001	Varón	3550
MCAD	2001	Varón	3990
MCAD	2002	Mujer	3530
MCAD	2002	Varón	2940
MCAD	2004	Varón	1700
MCAD	2004	Mujer	2500
MCC	2003	Varón	3370
MCC	2004	Varón	*
MMA	2000	Mujer	*
MMA	2003	Mujer	2140
MMA	2003	Varón	3980
MMA	2003	Varón	2820
MMA	2004	Varón	3530
MMA	2003	Varón	3300
MMA Trans	2003	Mujer	3625
PA	2005	Varón	3850
PG A	2004	Mujer	2700
SCAD	2001	Mujer	*
SCAD	2002	Varón	3560
SCAD	2004	Mujer	2990
SCAD	2005	Varón	2700

**Tabla 62. Alteraciones del metabolismo de ácidos orgánicos y carnitinas diagnosticadas mediante el Programa de Cribado Neonatal entre Jul 2000 y Dic 2005. (\*Dos casos de adopciones y uno nacido fuera de nuestra área).**

### 5.11. Estudio de la sensibilidad y especificidad del método de determinación de AC en sangre a partir de los diagnósticos realizados

Con el fin de evaluar la posible optimización de un programa de cribado basado en el método desarrollado y aplicado a un grupo de población neonatal, se ha estudiado el valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN), como indicadores de especificidad y sensibilidad respectivamente, que se tendría para aquellas patologías de AO y FAO detectadas mas frecuentemente y que por tanto permiten alcanzar resultados mas fiables. En las tablas siguientes se presentan los resultados obtenidos en los casos patológicos detectados durante el periodo incluido en el presente estudio, para las carnitinas implicadas en el diagnóstico de cada metabolopatía concreta (Tabla 63 a Tabla 68).

MCAD						
ID muestra	EdadEstTM (d)	PesoNac (g)	C8	C6	C10:1	C8/C10
1	4	2501-4100	1,35	0,30	0,27	6,62
2	7	2501-4100	1,07	0,28	0,17	7,33
3	6	2501-4100	2,19	0,46	0,74	7,53
4	6	1501-2500	3,56	0,76	0,22	11,01
5	10	2501-4100	2,78	0,50	0,61	7,94
6	23	1501-2500	7,02	0,82	0,67	10,30
7	6	2501-4100	0,97	0,36	0,42	1,64

Tabla 63. Resultados obtenidos en los casos patológicos diagnosticados de MCAD en el periodo del estudio

GA I					
ID muestra	EdadEstTM (d)	PesoNac (g)	C5DC	C5DC/C16	C5DC/C2
1	7	2501-4100	0,24	0,10	0,02
2	7	>4100	0,51	0,23	0,04

Tabla 64. Resultados obtenidos en los casos patológicos diagnosticados de GA I en el periodo del estudio

LCHAD					
ID Muestra	EdadEstTM (d)	PesoNac (g)	C16OH	C18-1OH	C18-2OH
1	3	2501-4100	0,80	1,11	0,37
2	6	2501-4100	2,57	1,76	0,12
3	4	1501-2500	0,73	0,57	0,08

Tabla 65. Resultados obtenidos en los casos patológicos diagnosticados de LCHAD en el periodo del estudio

## Parte experimental

MMA					
ID Muestra	EdadEstTM (d)	PesoNac (g)	C4DC	C3	C3/C2
1	4	2501-4100	0,25	5,04	0,13
2	296	-	0,74	0,65	0,04
3	5	2501-4100	0,13	1,20	0,04
4	103	2501-4100	0,71	1,05	0,09
5	3	2501-4100	0,35	6,60	0,14
6	11	1501-2500	0,09	0,70	0,05

Tabla 66. Resultados obtenidos en los casos patológicos diagnosticados de MMA en el periodo del estudio

MCC				
ID Muestra	EdadEstTM (d)	PesoNac(g)	C5OH	C5OH/C16
1	3	2501-4100	0,77	0,32
2	275	-	0,87	0,83

Tabla 67. Resultados obtenidos en los casos patológicos diagnosticados de MCC en el periodo del estudio

SCAD						
ID Muestra	EdadEstTM (d)	PesoNac(g)	C4	C4/C2	C4/C3	C4/C8
1	4	2501-4100	1,10	0,05	0,40	13,94
2	107	2501-4100	3,23	0,11	1,98	55,50
3	5	2501-4100	1,19	0,07	1,04	17,54
4	292	-	0,97	0,16	2,50	2,56

Tabla 68. Resultados obtenidos en los casos patológicos diagnosticados de SCAD en el periodo del estudio

En las patologías en que se consideró de interés (MCAD, LCHAD, SCAD y GA I) se estudió una posible optimización de los puntos de corte manejados en la primera semana de vida, de las principales carnitinas y / o ratios implicadas en sus correspondientes diagnósticos, para tratar de mejorar los valores predictivos del programa. En las tablas siguientes se presentan los resultados correspondientes a esta posible optimización de los puntos de corte (Tabla 69 a Tabla 72).



*Parte experimental*

C8		CORTE=0,52 (p99,99)		VPP	35,00%
		Enfermos	Sanos	VPN	100,00%
Positivos	7	13	S	100,00%	
Negativos	0	92756	E	99,99%	

C6		CORTE=0,290 (p99)		VPP	0,65%
		Enfermos	Sanos	VPN	100,00%
Positivos	6	916	S	85,71%	
Negativos	1	91853	E	99,01%	

C8/C10		CORTE=3,543 (p99,9)		VPP	5,88%
		Enfermos	Sanos	VPN	100,00%
Positivos	6	96	S	85,71%	
Negativos	1	92673	E	99,90%	

C8>0,520 + C8/C10>3,543				VPP	100,00%
				VPN	100,00%
Positivos	7	0	S	100,00%	
Negativos	0	92769	E	100,00%	

Tabla 69. Posible optimización de los puntos de corte para el diagnóstico de MCAD

C5DC		CORTE=0,233 (p99,9)		VPP		2,38%
		Enfermos	Sanos	VPN		100,00%
Positivos	2	82		S		100,00%
Negativos	0	92690		E		99,91%

C5DC/C2		CORTE=0,017 (p99,9)		VPP		4,65%
		Enfermos	Sanos	VPN		100,00%
Positivos	2	41		S		100,00%
Negativos	0	92731		E		99,96%

C5DC/C2>0,017 + C5DC>0,233				VPP		8,33%	
				Enfermos	Sanos	VPN	100,00%
Positivos		2	22	S		100,00%	
Negativos		0	92750	E		99,98%	

Tabla 70. Posible optimización de los puntos de corte para el diagnóstico de GA I

*Parte experimental*

<b>C16OH</b>	<b>CORTE=0,20 (p99,99)</b>		<b>VPP</b>	27,27%
	<b>Enfermos</b>	<b>Sanos</b>	<b>VPN</b>	100,00%
<b>Positivos</b>	3	8	<b>S</b>	100,00%
<b>Negativos</b>	0	92763	<b>E</b>	99,99%

<b>C18-1OH</b>	<b>CORTE=0,24 (p99,99)</b>		<b>VPP</b>	25,00%
	<b>Enfermos</b>	<b>Sanos</b>	<b>VPN</b>	100,00%
<b>Positivos</b>	3	9	<b>S</b>	100,00%
<b>Negativos</b>	0	92762	<b>E</b>	99,99%

<b>C16OH&gt;0,20 + C18-1OH&gt;0,24</b>			<b>VPP</b>	37,50%
	<b>Enfermos</b>	<b>Sanos</b>	<b>VPN</b>	100,00%
<b>Positivos</b>	3	5	<b>S</b>	100,00%
<b>Negativos</b>	0	92768	<b>E</b>	99,99%

Tabla 71. Posible optimización de los puntos de corte para el diagnóstico de LCHAD

<b>C4/C2</b>	<b>CORTE=0,050 (p99,9)</b>		<b>VPP</b>	1,46%
	<b>Enfermos</b>	<b>Sanos</b>	<b>VPN</b>	100,00%
<b>Positivos</b>	2	135	<b>S</b>	100,00%
<b>Negativos</b>	0	92637	<b>E</b>	99,85%

<b>C4</b>	<b>CORTE=1,07 (p99,95)</b>		<b>VPP</b>	4,08%
	<b>Enfermos</b>	<b>Sanos</b>	<b>VPN</b>	100,00%
<b>Positivos</b>	2	47	<b>S</b>	100,00%
<b>Negativos</b>	0	92725	<b>E</b>	99,95%

Tabla 72. Posible optimización de los puntos de corte para el diagnóstico de SCAD



**Discusión**



### 1. Características del método

La MS-MS es un método que realiza la separación y análisis de una mezcla de componentes, después de ser ionizados mediante una técnica suave, como es el electrospray.

La primera aplicación al diagnóstico clínico y más conocida en el estudio de perfiles de AC es la desarrollada por Millington<sup>74</sup> y su empleo para el cribado neonatal fué sugerido por el mismo incluso dos años antes de su publicación.<sup>75</sup> Se trata del desarrollo de un método automatizable en parte, al trabajar con micro placas y ha sido incluido en el Cribado Neonatal por algunos laboratorios en los últimos años pero ninguno en España hasta el momento en que lo introdujimos nosotros.

Su versatilidad se deriva de ser una técnica muy fiable, prácticamente libre de interferencias y muy rápida.<sup>76</sup> La consecuencia es que, pese al elevado precio de los instrumentos, es una técnica muy recomendable en términos de coste/efectividad.

Esto se debe a que apenas hace uso de reactivos y consumibles y tiene una elevada practicabilidad al poder automatizarse también la etapa de preparación de las muestras y permitir obtener simultáneamente perfiles de metabolitos, las denominadas “Técnicas Múltiples”.

Los análisis de AC se realizan sobre muestras de sangre recogida sobre papel, preferentemente tras varias horas de ayuno, se recomienda no pasar nunca de seis, para favorecer la acumulación de metabolitos diagnósticos.

Una AC es un aciléster graso de la L-Carnitina. La familia AC analizadas por MS-MS incluye grupos acil-grasos de especies saturadas e insaturadas de entre 2 (C2) y 20 carbonos como grupos alifáticos.<sup>77</sup> Los hidroxiácidos grasos y los ácidos dicarboxílicos de las AC también son deuterados.<sup>78</sup> Algunos fármacos como el ácido valproico, piválico o benzoico también producen una AC. Todas las AC son analizadas exclusivamente mediante un ensayo de precursores de un ión de masa, común a todas.<sup>79</sup>

El fragmento común para las AC, derivatizadas o no, es de 85 m/z, su estructura es bien conocida hace tiempo y es esencialmente el “carnitine backbone” producido por pérdidas de los butilésteres, amonio cuaternario, y los ácidos grasos. Inicialmente se trabajó con

## ***Discusión***

metilésteres,<sup>80</sup> que pierden un fragmento de 99 m/z, similar, pero se abandonó porque los metilésteres no se fragmentan tan fácilmente.

Existen laboratorios que hacen análisis directo de las AC extraídas sin derivatización. Esto presenta ventajas porque simplifica la preparación de las muestras y evita potenciales errores derivados de la esterificación ácida asociada a la hidrólisis inducida de las AC de cadena corta que provoca resultados erróneos de la carnitina libre.<sup>81</sup> Sin embargo, conducen a un mayor número de interferencias cuando se utilizan perfiles de análisis con muchas AC, son menos específicos, y además son menos sensibles para las AC dicarboxílicas<sup>61,82</sup> y para los compuestos vinculados al IS de C8 por el incremento de la nube de iones cargados o neutros a partir de los grupos de ácidos carboxílicos sin derivatizar.

La carnitina libre (C0) produce fragmentos de 85 y 103 m/z, pero este último incluye el grupo alifático –OH, requiere mayor energía de fragmentación que el otro y en consecuencia se encuentra en mayor abundancia. Sin embargo, este fragmento no se produce para las AC porque el grupo –OH forma parte del otro fragmento producido. Así pues, aunque para medir la carnitina libre se pueden usar los dos, no es válido para las AC. Si no se derivatiza sólo vale el de 85 m/z<sup>83</sup> y tampoco está demostrado que se disminuya la hidrólisis.

Esta pérdida de un ión común de 85 m/z permite realizar barridos de masas de compuestos de hasta 20 carbonos y con un PM de cerca de 500 Da. En consecuencia, los equipos de MS/MS utilizados para el diagnóstico de ECM no precisan trabajar en un rango de masa muy amplio pues raramente se pasa de una relación masa/carga de 600. Se precisa una relativamente alta precisión de masa y por ello, como puede verse en la Figura 11, se realiza un calibrado a 7 puntos que incluye tres dentro del rango de masa de trabajo con una tolerancia límite de 0.05Da en la asignación de la masa.

Los equipos de MS/MS son muy estables y en nuestra experiencia, pese a lo intenso del trabajo, no es preciso realizar calibraciones con frecuencias superiores a un mes salvo que se produzca alguna incidencia grave o una disminución de la sensibilidad. La causa más frecuente de una pérdida de sensibilidad es una disminución en la respuesta del detector y esto, Figura 12, se corrige aumentando el voltaje de trabajo mientras no se alcancen límites que comprometan la relación señal/ruido. No obstante, la principal, causa de disminución

## Discusión

de la señal es la supresión de la ionización o de la fragmentación derivada de la suciedad interior del equipo. Es posible minimizar este problema trabajando en una zona sub-óptima con la fuente de ionización donde la sensibilidad del equipo es suficiente y se evita en buena medida la introducción de suciedad. Trabajando de esta manera, y realizando limpiezas semanales hasta el orificio de entrada, no resultó necesario romper el vacío del instrumento con el fin de limpiar su interior más de cuatro veces al año, dos de ellas durante los mantenimientos preventivos que se realizan de forma periódica.

Una fase crítica en el desarrollo de un método por MS/MS es el estudio de la fragmentación de los compuestos a medir y el establecimiento de las masas exactas a que se encuentran. En el ensayo de precursores de  $m/z$  85.1, una vez puesto a punto el estudio de la fragmentación, no lo es tanto por tratarse de un barrido altamente específico como consecuencia de la derivatización de los compuestos. Se obtienen una serie de butilésteres que tienen una estructura similar y en consecuencia el fragmento a buscar es de masa fija. En contrapartida, se trata de un espectro en el que son susceptibles de aparecer hasta más de 40 acilcarnitinas, Tabla 2, que es necesario identificar para su correcta cuantificación.

El ajuste de los parámetros instrumentales, Tabla 3, no resultó muy complicado y tan sólo es de destacar la rampa introducida en el DP con el fin de favorecer la fragmentación de las AC de cadena larga. De hecho, se ha propuesto la posible ampliación de este experimento a AC de cadenas superiores a 20 carbonos con el fin de obtener información útil para el estudio de enfermedades peroxisomales<sup>84</sup> haciendo uso de variaciones en el DP.

La MS/MS no permite distinguir entre compuestos de un mismo PM salvo que se proceda a una separación previa. En consecuencia no permite distinguir isómeros, interferencias isoméricas, ni compuestos de un mismo PM, interferencias isobáricas. Las primeras carecen de importancia en el caso de las AC pero sí existen, en cambio, algunas posibles, interferencias isobáricas, Tabla 4. Las interferencias espectrales apenas se producen, debido a lo específico de la derivatización con butanol en medio ácido, que se realiza previamente.

Las muestras de sangre impregnada sobre papel han sido un gran avance para el desarrollo de estudios de diagnóstico precoz sobre grupos de población amplios y son sin duda las más adecuadas para el desarrollo de métodos de cribado de ECM en la población neonatal.



## ***Discusión***

Existen numerosas recomendaciones acerca del momento y forma de realizar la toma de estas muestras,<sup>17, 18</sup> así como sobre su manejo y condiciones de almacenamiento.<sup>85,86</sup>

Existe consenso general en que la MS/MS ha aumentado la sensibilidad para los análisis de AC hasta el punto de que permitiría el diagnóstico con muestras tomadas antes de las 24 horas después del nacimiento y con una mejora en la especificidad que hace que no se produzca un elevado número de falsos positivos. Sin embargo, existen situaciones donde la mas lenta elevación del marcador diagnóstico puede dar lugar a falsos resultados negativos y esto hace que en la actualidad se recomiende efectuar la toma de muestra lo más temprana posible, pero no antes de las 48 y 72 horas de vida.<sup>9,10</sup> Esto conlleva un problema logístico, debido a que en muchas ocasiones los niños no permanecen en los hospitales de nacimiento más allá de dos días y existe el riesgo de que en algún caso no se realice la toma de muestra.

Las muestras de sangre tomadas del talón del niño están sujetas a variaciones debido a la influencia del hematocrito sobre la viscosidad de la sangre<sup>87</sup> y, en consecuencia, sobre su difusión en el papel, que pueden conducir a una heterogénea distribución de los metabolitos entre el centro y las zonas periféricas de la mancha de sangre. Este hecho adquiere especial relevancia por sus considerables variaciones interindividuales,<sup>88,89</sup> que en el caso de los niños prematuros se acrecienta aún más.

Para el análisis de AC se utiliza un disco de 3 mm de diámetro, o también de 1/8 de pulgada que se corresponde con un tamaño ligeramente superior, a partir del cual son eluidos los metabolitos. El volumen de sangre que contiene, 3.4  $\mu$ L cuando el papel es el S6S 903 y el hematocrito del 55%, se utiliza para la cuantificación y puede variar de forma significativa con el tipo de papel empleado y con el hematocrito y el volumen de sangre utilizado para impregnar las manchas. Se han encontrado diferencias de hasta un 28% en los resultados,<sup>41,90</sup> asociadas solamente a estos factores. De modo general, las concentraciones de AC aumentan con el hematocrito y son mayores en los bordes de las manchas de sangre.

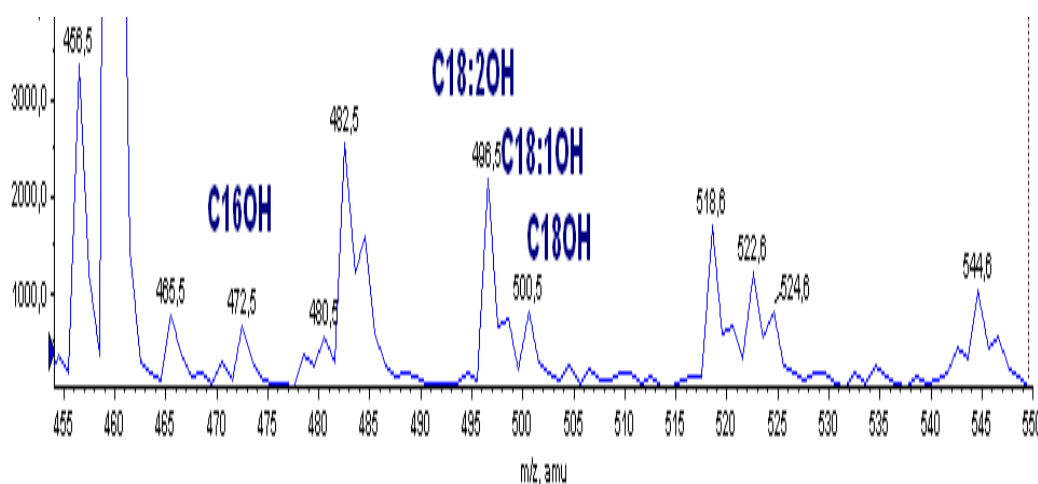
La concentración de algunas AC se ve afectada por el tiempo transcurrido desde la toma de muestra hasta su análisis. La C2, en concreto, se degrada con cierta rapidez. El resto de AC son relativamente estables, aunque las de cadena corta lo hacen un poco más rápidamente y esto se ve muy favorecido si la muestra no es secada de forma adecuada. En términos

## Discusión

generales, no obstante, se trata de muestras muy estables y esto ha favorecido su uso para estudios post-mortem y en casos de muerte súbita.<sup>43,91</sup> En los estudios a largo plazo, se ha observado un incremento de la carnitina libre durante los primeros 5 años de almacenamiento para comenzar un lento descenso después y una disminución anual de un 18.5% para la C2 y de un 27.4% para la C3, que las hacen inservibles para el diagnóstico de algunos ECM, para la MMA p.ej., si no se hace una corrección de los valores.

En nuestro caso, las muestras son enviadas por correo urgente al laboratorio y sufren una demora media de 4 días. Una vez recibidas, el tiempo de análisis es inferior a otros cuatro días para el 90% de ellas y nunca superior a una semana. Las muestras son almacenadas a 4°C durante un período máximo de 14 días y después son congeladas a -20°C durante dos años. Pasado este tiempo, las muestras son almacenadas a temperatura ambiente.

En nuestra experiencia, para muchas de las patologías buscadas las muestras son válidas durante 5 e incluso 10 años sin recurrir a una corrección de los valores. En nuestro laboratorio se han realizado dos confirmaciones diagnósticas de pacientes que, una vez recuperadas las muestras del momento del nacimiento, seguían siendo claramente patológicas. En el primero de ellos, se trataba de una VLCAD y, en el segundo, de una LCHAD. En la Figura 48 puede verse como, tras 8 años de almacenamiento, el espectro de este último sigue teniendo claramente elevadas las AC OH derivadas de cadena larga.



**Figura 48.** Espectro de PS de masas 85.1 de una muestra de sangre en papel proveniente de un paciente con LCHAD tomada en 1997 y analizada en 2005.

## ***Discusión***

Un punto importante en el método de cuantificación de AC en sangre lo constituyen los IS usados para realizar la dilución isotópica dentro del proceso de preparación de las muestras. Existen pocas opciones en el mercado y a nuestro entender la que permite una mas adecuada y estable estandarización es la mezcla comercializada por CIL. Consiste en una mezcla de 8 acilcarnitinas, Tabla 5, que es necesario reconstituir con 1 mL de metanol antes de ser utilizada y que a su vez es diluida 1/100 para ser añadida a las tandas de trabajo. Aunque se han publicado casos de problemas de estabilidad con la DC8,<sup>92</sup> en nuestra experiencia de más de 6 años, no hemos observado este tipo de problemas. En cambio, sí se han producido, en dos ocasiones, errores en la formulación, que nos han obligado a reanalizar muestras y que fueron oportunamente detectados mediante el sistema de CC instaurado puesto que en ambos casos las circulares de corrección de la formulación fueron recibidas tarde.

Un punto de constante preocupación en nuestro laboratorio ha sido el control de errores sistemáticos en el manejo de muestras y patrones y en este sentido desde el inicio consideramos un punto débil la preparación diaria que es necesario realizar de los IS en metanol. Todo el material volumétrico es periódicamente calibrado en el laboratorio pero estas operaciones se realizan con agua y por tanto cuando se realizan manipulaciones con disolventes poco higroscópicos, como el metanol, existe un riesgo importante de que los volúmenes manejados sean erróneos. Como se puede ver por los datos que aparecen en la Tabla 6, existen diferencias muy importantes en función de la forma de trabajo a la hora de manejar el metanol. Tras los experimentos realizados, dicho problema pasó a un segundo plano y la corrección del cálculo realizada supuso una mejora importante en la exactitud del método. Con todo, existe siempre cierta inquietud cuando es necesario realizar dispensaciones sucesivas para la preparación de las placas pues, a lo descrito anteriormente, se añade el carácter volátil y tóxico del metanol. Como medio de control se realiza siempre la preparación de un volumen controlado y se mide el volumen sobrante para asegurarse de que no se producen manipulaciones malas o poco reproducibles.

La extracción de las AC con metanol presenta habitualmente una recuperación superior al 90% y, aunque no existen dudas acerca de la eficiencia de dicha extracción,<sup>93</sup> debe tenerse presente que lo que se realiza no es exactamente una dilución isotópica sino una “pseudo” por las pérdidas de precisión y exactitud. Esto implica que el manejo de la muestra en

## ***Discusión***

papel no será totalmente volumétrico y, además, que se podrán producir pérdidas durante la extracción<sup>94</sup>.

El procedimiento de derivatización con butanol utilizado comúnmente, facilita la ionización y mejora la sensibilidad.<sup>74,75</sup> Se han descrito pequeñas variaciones en cuanto a las condiciones experimentales, pero esencialmente sigue siendo el más utilizado y las muestras así preparadas son finalmente reconstituidas en una mezcla de un disolvente orgánico y agua ligeramente acidificada.

La ionización por electrospray requiere que el disolvente utilizado sea volátil y esto hace que la práctica totalidad de los laboratorios utilice acetonitrilo en proporciones que van del 40 al 80%, así como ácido fórmico<sup>58</sup> al 0.025 a 0.1%, en este caso para acidificar.

El volumen de muestra, el flujo de trabajo en la infusión y, como consecuencia, el tiempo de análisis, guardan relación entre sí. Se suele seleccionar el volumen de forma que la zona de lectura, Figura 13, permita realizar entre 15 y 20 ciclos completos de medida de los experimentos que se encadenen. En nuestro caso se mantuvo entre 2.2 y 2.6 minutos.

Para su cuantificación, tal como se refleja en la Tabla 7, se asignó a cada AC el IS correspondiente en los casos en que se dispuso de él, y el más próximo por masa y estructura, en los restantes. En un apartado posterior se recoge el estudio realizado con el fin de ver la posibilidad de introducir nuevos IS además de los ya empleados. Tal como es de prever en función de las limitaciones en la estimación del volumen de muestra, las dificultades para una adecuada toma de muestra, el hematocrito, etc. los coeficientes de variación que se obtienen están usualmente entre el 10 y el 15%<sup>103</sup> o incluso mayores.

El trabajo en MS/MS conduce al manejo de una elevada cantidad de información y a la necesidad de un procesamiento informático que permita al laboratorio ser ágil en las conclusiones y no demore la toma de decisiones encaminadas a un diagnóstico precoz. En nuestro caso se realizó la adquisición de la información mediante el software Analyst y se procesó mediante el Chemoview que trabaja encadenado al anterior. Un punto importante es que la resolución empleada en el calibrado del instrumento permita la adecuada asignación de masas y en consecuencia de metabolitos (un ejemplo empleado a menudo es la interferencia derivada de la fragmentación del glutamato, cuyo fragmento mas importante es el de 84 Da, que se suma erróneamente al de 85 Da de las AC y viceversa) por parte de Chemoview. Una vez realizada esta, entran en juego los puntos de corte que se

## ***Discusión***

han seleccionado y el manejo de los correspondientes algoritmos que lleven a alertas y alarmas lo más precisas posible. En general, son los denominados casos “en el límite” (“borderline” en inglés) los que generan más confusión y conducen al mayor número de comprobaciones y es por ello que desde el inicio se planteó la necesidad de tener otra herramienta de trabajo específica para la validación continua de la información generada y de forma previa a la toma de decisiones. Téngase presente que la hoja de cálculo con los resultados de una tanda de muestras posee hasta 100 columnas y tantas filas como muestras más controles.

Esta herramienta necesaria fue objeto de diversos intentos de solución mediante variantes de herramientas clásicas en los laboratorios clínicos, como son las gráficas de Levey-Jennings, pero el hecho de que se trabaje con una técnica múltiple dificulta enormemente la labor de control y de seguimiento de los protocolos de CC por parte el responsable de su validación. Finalmente, la colaboración con el Centro de Genética Médica de Porto y la Escuela de Informática de la Universidad de Aveiro, ambos de Portugal, permitió el desarrollo del programa NeoScreen, que fue validado inicialmente y después utilizado por ambos centros para el control, en nuestro caso, y para el control y manejo de resultados en el caso del centro de Porto, responsable del cribado neonatal de ECM para todo Portugal.

NeoScreen es una base de datos diseñada para las necesidades específicas del trabajo de cribado neonatal de ECM por MS/MS. De modo que, una vez se le ha suministrado la información específica necesaria de controles, metabolitos y enfermedades, Figura 18 a Figura 21, y los criterios a seguir por los algoritmos que se le han introducido, permite que le sean incorporadas directamente las hojas Excel generadas por Chemoview, Figura 23, y hace una clasificación de los resultados de las muestras en distintas categorías desde normales a muy sospechosas, en función de la presencia o no de elevaciones de los metabolitos considerados diagnósticos. Además, representa gráficamente los resultados de los controles de cada uno de los metabolitos para su seguimiento y validación, Figura 25 y Figura 26.

La idea es sencilla pero el hecho de que responda exactamente a la filosofía de un laboratorio tan altamente especializado y se ajuste a las necesidades de manejo de la información generada con una estructura concreta, como es el Chemoview, lo hace extremadamente eficaz para el trabajo diario en el cribado de ECM.

## ***Discusión***

La versión desarrollada inicialmente tenía la parte de explotación de la información de la base de datos muy limitada, sin embargo en la actualidad Applied Biosystems ha adquirido a la Universidad de Aveiro la licencia de NeoScreen y está en preparación una versión mas completa para los usuarios de sus equipos.

Nuestra base de datos en NeoScreen posee en la actualidad, julio de 2007, información de cerca de 80.000 análisis de AC por MS/MS realizados en nuestro laboratorio.

### ***2. Control de Calidad en la determinación de AC en sangre***

El control de calidad (CC) es un apartado importante en el funcionamiento de un laboratorio clínico donde se desarrollan procedimientos que deben ser continuamente evaluados y validados para dar por buenos los resultados que suministran, y que deberán apoyar de forma inmediata la toma de decisiones que afectan a la salud de un gran número de individuos.

Por este motivo, el CC es en la actualidad una auténtica área de conocimiento y es objeto del trabajo de comités de garantía de calidad y de publicaciones específicas.

Fue necesario desarrollar procedimientos de CC específicos para el método analítico desarrollado, pero estos responden a criterios más generales.

Son muchos los factores por los que se ve afectado un método pensado para la detección neonatal de ECM, pero hay uno absolutamente particular, que es el uso de muestras de sangre sobre papel. La calidad de los análisis que se realicen estará fuertemente relacionada con la calidad de las manchas de sangre utilizadas y, en consecuencia, una inadecuada recogida o manejo de estas muestras puede alterar por completo el proceso analítico encaminado al diagnóstico precoz en los RN.

De igual manera, será necesario desarrollar procedimientos de CC específicos en base al uso exclusivo de estas muestras y esto va a definir en su totalidad tanto los programas como su funcionamiento.

La toma de muestra debe ser realizada en el momento oportuno para evitar la posibilidad de resultados dudosos debidos a la edad. Se debe extremar la precaución durante la impregnación de la sangre sobre el papel, para evitar resultados inexactos debidos a baja

## ***Discusión***

saturación o sobresaturación del papel. Un adecuado secado y un rápido envío al laboratorio suele prevenir su degradación<sup>95</sup>.

Diversas organizaciones han desarrollado materiales de control que se suministran en forma de manchas de sangre impregnada en papel y están específicamente orientados a los laboratorios de cribado neonatal. Se han publicado estudios sobre las características de estos materiales.<sup>96,97</sup>

Uno de los retos recientes ha sido el desarrollo de materiales para MS-MS debido a la complejidad de los sistemas multi-analito que miden numerosos metabolitos a la vez y para los cuales un caso positivo puede resultar no ya de la elevación de uno de ellos, sino de la de varios.

Una dificultad añadida, con los materiales desarrollados específicamente para sistemas multi-analito, es que frecuentemente no pueden ser utilizados por sistemas menos selectivos, del tipo de los ensayos fluorimétricos.

Otro problema frecuente en los PT es que, si el diagnóstico se establece en base a perfiles (p.ej MCAD) y estos sólo incluyen un marcador, p.ej. C8, estamos creando muestras artificiales que no reflejan la enfermedad de forma adecuada. Igualmente, ¿como puede a partir de sangre de adultos ser reproducida una muestra de un recién nacido?. Estos son algunos de los problemas planteados y de ellos se deriva la reflexión de que es necesario acumular experiencia y quizá aportar nuevos métodos de CC más adecuados al cribado multianalito usando MS-MS.

Los procedimientos relacionados con el CC incluirán, por tanto, la medida rutinaria de muestras con las que establecer el CC interno y en base a las cuales dar por válidos los resultados y muestras de PT, o CC externo con el que realizar el aseguramiento de la calidad de los resultados, que periódicamente sean analizadas. Con este fin, existen recomendaciones y protocolos elaborados por el CLSI tanto para el diseño de los experimentos como para la evaluación de los resultados.

Los procedimientos utilizados en MS/MS, usando muestras impregnadas en papel, no implican un manejo “volumétrico”, sino que son semicuantitativos o casi-cuantitativos y esto debe considerarse a la hora de manejar los resultados, pues conlleva admitir una imprecisión relativamente elevada.

## ***Discusión***

Otro capítulo importante es la armonización de los resultados tanto intralaboratorio como interlaboratorios. Se supone que la cuantificación de un analito por parte de un laboratorio debería producir resultados homogéneos, pero esto es frecuentemente alterado por errores en la pesada de IS o en los disolventes manejados o a pequeñas diferencias entre los equipos de MS/MS. El CLSI dispone de un documento útil en este apartado.<sup>98</sup>

En MS/MS lo habitual es hacer medidas multianalito dentro de un mismo análisis, con lo cual este problema se acrecienta. En el presente trabajo se midieron más de 40 AC, usando 12 IS, y se manejaron también varios ratios de AC. Los criterios de aceptabilidad en esta situación, incluidos en el CC, requieren una consideración aparte.

Se incluyeron controles para el mayor número posible de AC y en todos los ensayos. Estos controles se manejaron igual que los de otros ensayos de modo que, cuando los resultados de un analito estuvieron “fuera del rango de tolerancia establecido”, se repitió el ensayo. Sólo se reexaminaron los valores del metabolito afectado por dicho control. Como norma, siempre que los controles de al menos tres analitos estuvieron fuera del rango de tolerancia, se descartó la tanda por completo. Recomendaciones similares se han establecido poniendo el umbral de repetición en cinco analitos. En lo referente a los analitos para los cuales no existen materiales de control, se realizó el cálculo con respecto a aquellos que caían en una zona de masas próxima. De igual manera, para aquellos analitos para los que no existía IS, se realizó el cálculo en base al más parecido en masa y estructura.

En cuanto a los ratios entre metabolitos, son con frecuencia mejores indicadores que los propios analitos considerados por separado, puesto que sufren menos variaciones y suelen ser más precisos y exactos. Esto se debe a que las desviaciones que se producen, en función de su origen, pueden corregirse en parte y convertir al ratio en un indicador más estable que los valores individuales.

A continuación se revisan los resultados obtenidos en los diferentes programas de evaluación de la calidad específicos para MS/MS.

### **2.1. Programa de Aseguramiento de la Calidad en Cribado Neonatal del CDC (NSQAP)**

Este programa se enmarca dentro de la división de ciencias del laboratorio del CDC, como se verá incluye programas de CC de PT y diferentes programas piloto, y se creó como



## ***Discusión***

voluntario y no regulamentario para ayudar a los laboratorios estatales de cribado a mantener y mejorar la calidad de sus resultados. Funciona mediante una colaboración entre el CDC y la asociación de laboratorios de salud pública (APHL) de Estados Unidos y da servicio a 73 laboratorios de cribado dentro del país pero también a otros 300 de 58 países diferentes y a 29 empresas que manufacturan productos para el diagnóstico en este campo. El NSQAP da servicios a los laboratorios participantes de formación, recomendaciones, consulta, PT y materiales de referencia y funciona desde hace casi 30 años.<sup>99</sup>

Desde su creación, este programa ha sido pionero en la distribución de materiales en forma de manchas de sangre seca impregnadas sobre papel. En 2001 comenzó con el programa piloto de PT en laboratorios que trabajan por MS/MS, convirtiéndose en permanente en 2002. En 2007 ha comenzado un nuevo programa piloto para añadir nuevas AC a dicho programa.

El papel utilizado es seleccionado y comprobada su capacidad de absorción, tanto con sangre con hematíes lisados como enteros, con el fin de corregir las diferencias debidas a los diferentes lotes de fabricación.

Las muestras suministradas proceden de donantes y en todas ellas se hace un ajuste del hematocrito al 55% con el fin de tener una óptima homogeneidad en la preparación y en los resultados obtenidos.

A partir de la información recibida de los laboratorios participantes, el CDC suministra puntos de corte, o niveles de decisión a partir de los cuales un resultado es presuntamente positivo o negativo, que están a disposición en su web en caso de que alguno de los participantes desee utilizarlos.<sup>100</sup>

Los métodos utilizados por los laboratorios que realizan determinaciones de AC por MS/MS se agrupan de forma sencilla en cuatro: aquellos que derivatizan y que no derivatizan y no utilizan el único kit comercial existente y los mismos grupos pero usando dicho kit. En el conjunto de laboratorios, en 2005, casi el 92% derivatizaban (el 74% usando métodos desarrollados en los propios laboratorios) y el 8% no derivatizaban (repartidos más o menos a la mitad, usando el kit). Estas cifras variaron ligeramente en el 2006 aumentando el número de laboratorios que no derivatizan hasta el 12%, una vez que el kit comercial fue aprobado en Estados Unidos.

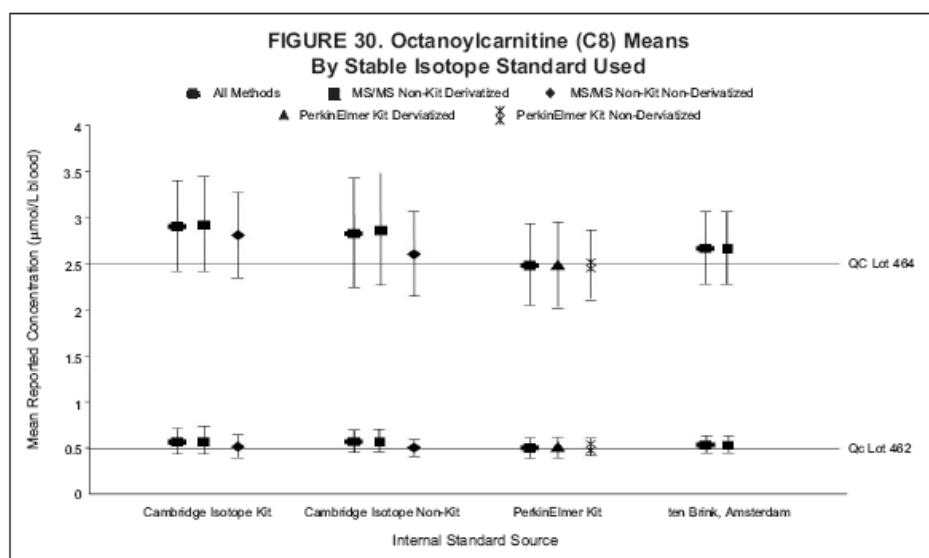
### 2.1.1. Programa de CC del CDC

Se suministran semestralmente muestras para un uso periódico y con el fin de que los laboratorios puedan alcanzar y mantener un alto grado de seguridad y continuidad en sus resultados al margen de posibles cambios por parte de empresas fabricantes de productos o alteraciones de los procedimientos analíticos.

Este programa incluye AC pero también AA, hormonas, etc. de modo que aunque participan cerca de 300 laboratorios en él solamente en torno a 120 suministran resultados de AC y 41 de los cuales eran de Estados Unidos en el 2005.

Se envían cuatro muestras que corresponden a una base y a tres enriquecimientos diferentes de AC y se acompaña de una carta con el certificado de composición. Cada laboratorio envía sus resultados de cinco días diferentes a su elección y medidos por duplicado con lo que los intervalos inter ensayo son diferentes.

Los resultados recibidos permiten hacer valoraciones en función de la forma de trabajo, del IS usado, etc. A modo de ejemplo, en la Figura 49 aparecen los resultados de C8 y se puede comprobar como no se ven afectados por el tipo de preparado usado como IS aunque existe una pequeña diferencia en función de que se trabaje derivatizando o no.



**Figura 49. Valores medios de C8 en función del IS usado**

En las tablas resumen de resultados, que se incluyen en el informe, se ofrecen datos de la DE intralaboratorio y total para cada componente agrupados por método analítico y las

## ***Discusión***

rectas de regresión que se tienen al comparar cada método frente al valor teórico de las concentraciones añadidas en el enriquecimiento. Los valores fuera del 99% del intervalo de confianza se consideran aberrantes y no se incluyen en los cálculos.

Las desviaciones que se produzcan en la pendiente pueden, pues, conducir a problemas con el calibrado o a malas recuperaciones analíticas y puede considerarse que si los valores de la pendiente son substancialmente diferentes de 1 es que existen desviaciones en el método analítico utilizado.

Para las AC, haciendo un análisis de los resultados de 2005, se observan varios métodos con resultados poco satisfactorios atendiendo a las pendientes. Así, para C2 dos de ellos no pasan de 0.71 y para C5DC se encuentran valores en un rango entre 0.25 y 1.85 explicables en función del IS usado. Para C10, asimismo, dos métodos presentan pendientes en torno a 1.20.

En otros casos como C3, C4, C5, C6, C8 y C16 los resultados son buenos en general con todos los métodos.

Los resultados no son enviados a los usuarios agrupados en función del IS usado, solo del método, y esto produce cierta confusión para algunas de las tablas de resultados de AC.

En la Tabla 8 y la Tabla 9 se ha hecho un resumen de los resultados obtenidos con las muestras del CC del CDC a lo largo de todo el año 2005. En el primer caso se corresponde a los valores de 183 tandas de trabajo, durante más de 7 meses, y en el segundo a 80 al corresponder en el primer caso con un mantenimiento de lote a lo largo de dos semestres consecutivos.

Pese a no estar incluidos todavía en ese año en el programa, se han incluido los valores para C0, C2 y C18. En este caso no se producen incrementos y sirven solamente para realizar una evaluación de la precisión con que se trabaja con estas tres AC. Los resultados han sido en los tres casos muy satisfactorios por tratarse de aportaciones endógenas y por tanto de niveles bajos de concentración.

Los resultados disponibles son consecuencia de la inclusión en todas las tandas de trabajo de los cuatro controles disponibles y que como se ha explicado anteriormente se corresponden con una muestra base y tres adiciones diferentes.

Los CV se corresponden bien en general con los obtenidos en la evaluación del método y con el hecho de que la contribución más importante a dichos CV es la intraserie.

## ***Discusión***

Se han obtenido CV elevados para C6, C8, C5DC y C10 en las muestras de concentración baja. Esto se debe a que en todas ellas el nivel de concentración endógeno es muy bajo.

Aparecen CV ligeramente más elevados de lo que sería de esperar, en el primer grupo de muestras, en el rango elevado de concentraciones de C16, debido probablemente a la presencia de algún valor anómalo que, por no afectar a la validación de las series, no fue eliminado.

En el resto de los casos son valores que demuestran el alto grado de calidad alcanzado en el proceso de estandarización del método y la robustez del sistema analítico empleado.

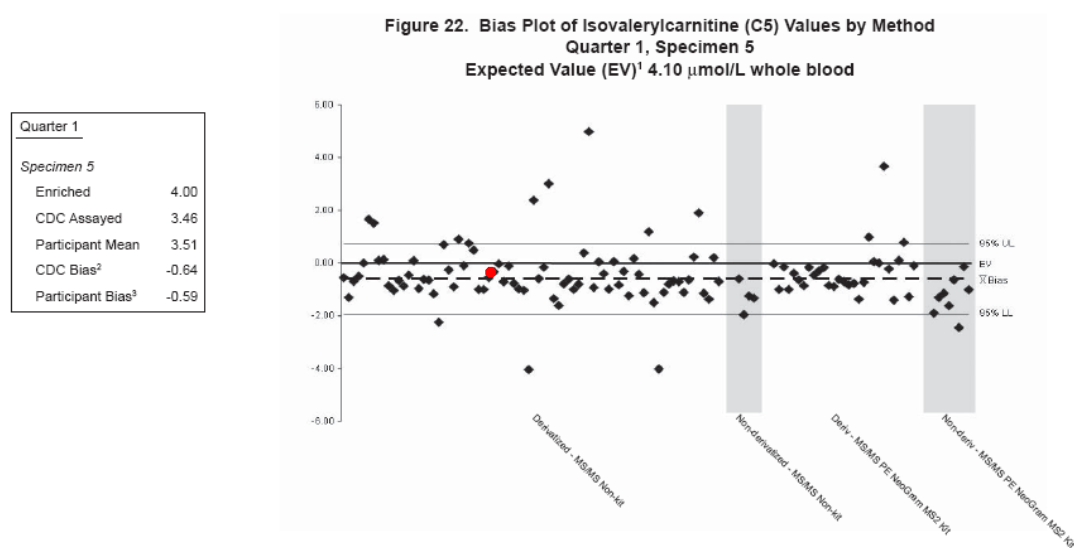
### **2.1.2. Programa de PT del CDC**

Se trata de un panel de muestras suministrado trimestralmente y en el que se ha realizado un enriquecimiento de los niveles endógenos de sus componentes con diferentes cantidades de AC. Las muestras así preparadas son impregnadas en manchas de 75 o 100  $\mu\text{L}$  que son enviadas a los laboratorios. Cada participante envía, en la actualidad por internet, resultados de cada AC, los puntos de corte en base a los cuales son asignadas como presuntamente positivas o negativas y dicha valoración con el fin de conocer los posibles falsos positivos o negativos correspondientes que se producirían.

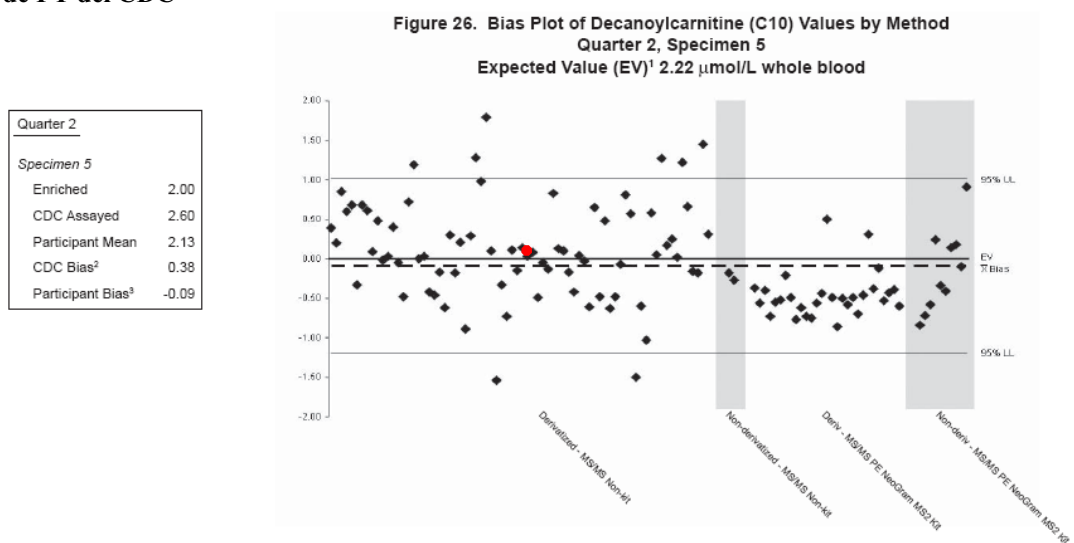
Se obtienen gráficas donde los laboratorios son agrupados por métodos y donde se pueden observar diferencias importantes en los comportamientos según la AC de que se trate. Se considera razonable una desviación menor del 20% respecto al valor esperado.

Tomando nuevamente los resultados de 2005 como base del análisis global, se puede ver que para algunas carnitinas como la C3 y C4 no se producen desviaciones claras de forma global en los resultados que suministran los laboratorios respecto al valor esperado por el enriquecimiento. Sin embargo para C5 (Figura 50), C5DC, C6 C14 y C16 los valores son sistemáticamente bajos sin depender del método utilizado. Para la C8 se producen ligeras desviaciones al alza en los resultados y para la C10 (Figura 51) son claramente más bajos los resultados que suministran los laboratorios que trabajan con un método concreto.

## Discusión



**Figura 50. Valores de C5 suministrados por los diferentes laboratorios dentro del programa de PT del CDC**



**Figura 51. Valores de C10 suministrados por los diferentes laboratorios dentro del programa PT del CDC**

Otro aspecto importante de la información suministrada por el PT del CDC es el relativo a los errores en la clasificación cualitativa de normales o sospechosos de patología. El número de falsos positivos, que afectan a la relación coste-beneficio y a la credibilidad del laboratorio, estuvo entre el 0.2 y el 1.9% de los resultados según la AC y el de falsos negativos, que comprometen el funcionamiento de un laboratorio de cribado, entre el 0.3 y

## Discusión

el 1.6%. El porcentaje mayor entre los primeros afecta a la C10 y entre los segundos a la C5DC, aunque con diferencias importantes entre los grupos de laboratorios de Estados Unidos y de fuera.

En el 2007 se ha puesto en marcha un programa piloto de PT que persigue incluir nuevas AC en el actualmente existente. Se ha hecho una primera distribución de muestras en que se pide a los laboratorios que respondan a C3DC, C6, C8, C10, C10:1, C14 y C14:1. De los 134 laboratorios participantes en la actualidad en el programa, solo en torno a treinta suministraron dichos resultados. Nuestro laboratorio respondió a todos ellos y con un resultado plenamente satisfactorio al haber asignado el 100% de ellos de modo correcto.

### 2.2. Programa de aseguramiento de la calidad cualitativo para AC en sangre de ERNDIM

Este programa de medida de AC en muestras de sangre en papel, coordinado desde el Guy's Hospital de Londres, vinculado al King's College de la Universidad de Londres, por el Dr. Charles Turner por encargo del ERNDIM, nació con un planteamiento ligeramente diferente al del CDC. Se trata de un programa específico para AC pero no para control de programas de cribado neonatal. Se centra más en cuestiones metodológicas y su influencia sobre los resultados. Por ejemplo butilando frente a medida directa o MRM frente a Scan (Figura 52).

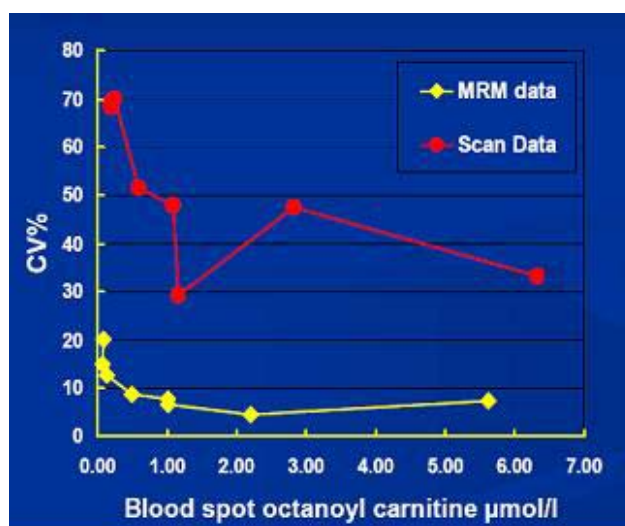


Figura 52. Grafica de CV para C8 entre los participantes en el programa del ERNDIM, en función del modo de medida.

## ***Discusión***

Incluye además a la carnitina libre entre sus resultados y nació tras un año de funcionamiento piloto para ver su interés y recoger a través de un cuestionario lo que buscaban los usuarios.

Su principal característica es que hace uso de muestras procedentes de pacientes reales de las que se solicita una interpretación cualitativa y cuantitativa de los resultados, de forma similar a como se hace en el programa de ácidos orgánicos en orina, con el fin de que sea un ejercicio de aprendizaje diagnóstico tanto al ser analizadas las muestras como al recibir los informes.

Durante los años 2004 y 2005 se hicieron 5 envíos que incluyeron pacientes con MCAD, Aciduria Malónica, VLCAD, GA 1, etc. algunos de los cuales estaban sometidos a tratamiento, pero también muestras “normales”. Estas últimas suelen corresponder a pacientes pero de patologías no metabólicas, con lo cual frecuentemente se obtiene en ellas resultados anormales pero que no son sugerentes de ningún ECM en concreto y que provocan un debate también de interés para los participantes y que demuestran las dificultades que entraña establecer una hipótesis correcta a través de un único análisis por muy potente que sea.

El material enviado se obtiene extrayendo 4 mL de sangre con heparina de litio. Con estas muestras se impregnan manchas de 40  $\mu$ L, sobre papel SS903, que son secadas a temperatura ambiente 24h antes de ser enviadas. Se envía una única mancha a cada laboratorio.

La participación ha ido en aumento desde los 45 laboratorios iniciales hasta los más de 70 del año 2006, casi todos europeos.

Conclusiones de la participación son: (a) que el análisis de AC en sangre debe formar parte de la investigación de un laboratorio metabólico, además de su uso en cribado, y (b) que no hemos observado diferencias importantes en función de que se use butilación o no pese a que hay claras ventajas de rapidez en un caso y de robustez en el otro.

Finalmente, el trabajo con muestras clínicas reales permite a los laboratorios adquirir experiencia con las diferentes formas de presentación que siempre acompañan a los ECM y el foro de participantes es muy rico en la información que maneja.

## *Discusión*

### **2.3. Programa de aseguramiento de la calidad para AC en sangre de Hamburgo**

Se trata de un programa para AC y AA en sangre en papel y está coordinado por el Dr Zoltan Lukacs, del Hospital Universitario de Hamburgo en Alemania.

Los participantes reciben tres muestras en cada envío y se les solicita resultados cualitativos, sospecha diagnóstica, y cuantitativos. Estos últimos son remitidos mediante una hoja Excel conjuntamente con sus puntos de corte.

Los datos cualitativos reflejan el aspecto más importante si el laboratorio trabaja en cribado neonatal, sin embargo los cuantitativos permiten ser comparados pese a las limitaciones del tipo de muestra y técnica utilizadas. Hace uso también de datos de ratios entre AC, único programa que lo hace, y también de porcentajes de desviación respecto a los puntos de corte cuantitativos si están disponibles.

De los 40 laboratorios participantes en 2005, Figura 53, todos menos cinco realizaban butilación de las muestras.

**Table 1** Participants of the 2005 QA program (2<sup>nd</sup> installment)

<b>Country</b>	<b>Number of Participants</b>
<i>Germany</i>	12
<i>Austria</i>	1
<i>Switzerland</i>	1
<i>Spain</i>	2
<i>Belgium</i>	1
<i>Portugal</i>	1
<i>Poland</i>	1
<i>Korea</i>	1
<i>Australia</i>	1
<i>USA</i>	8
<i>Canada</i>	3
<i>UK</i>	3
<i>Finland</i>	1
<i>Italy</i>	1
<i>France</i>	1
<i>Japan</i>	1
<i>Iceland</i>	1
<i>Mexico</i>	1

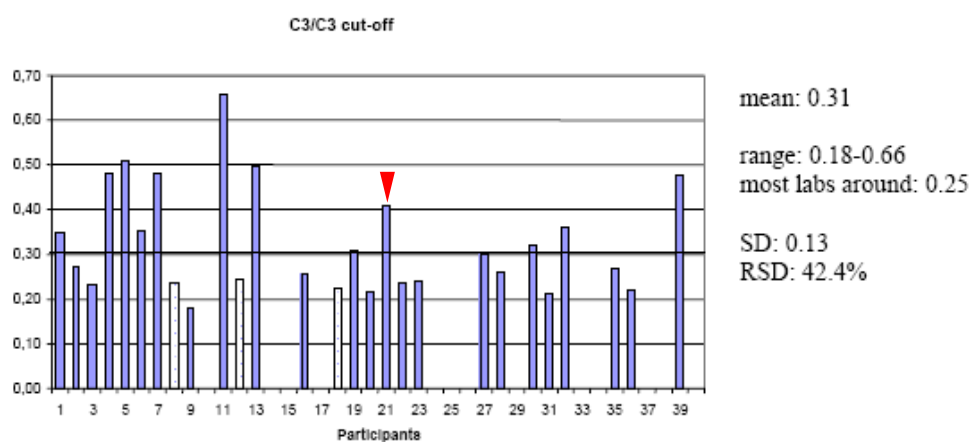
**Figura 53. Distribución de los laboratorios participantes en el programa de CC de Hamburgo**



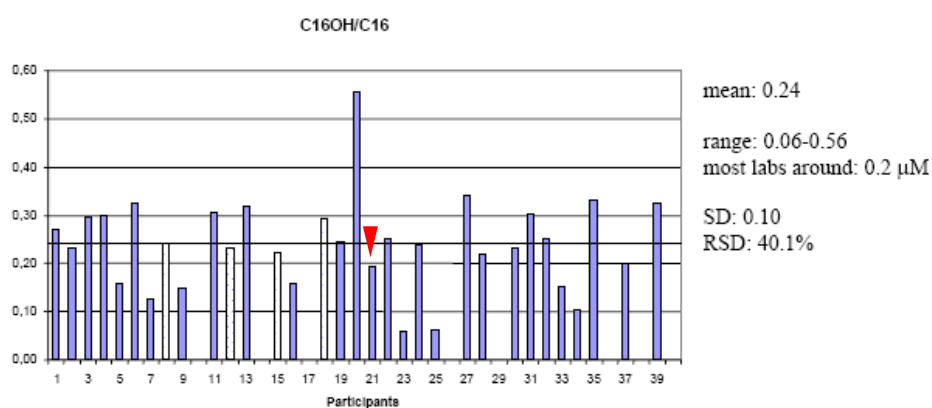
## Discusión

Este programa hace uso de muestras de origen humano provenientes de donantes y entre ellas se incluyen asimismo muestras normales. Cada participante recibe tres muestras que deben ser analizadas de forma rutinaria.

En la Figura 54 y la Figura 55 que se acompañan se pueden ver gráficos de este programa tanto de comparación de los valores con los puntos de corte como de ratios de AC. En ambos casos las barras transparentes se corresponden con laboratorios que no realizaban butilación de las muestras y que, como puede comprobarse en ellas, en estos casos no afectan a los resultados.



**Figura 54. Relación entre C3 y punto de corte para C3 entre los participantes del programa de CC de Hamburgo para la muestra 5/05.**



**Figura 55. Ratios de AC suministrados por los laboratorios participantes en el programa de Hamburgo para la muestra 6/05.**

El hecho de ser un programa también para AA hace que la información suministrada, a la hora de hacer valoraciones cualitativas, sea más completa y permita establecer criterios más claros conjuntamente con la información clínica suministrada de los pacientes de los que provienen las muestras.

### ***3. Proceso de verificación del método. Criterios del CLSI***

Las técnicas de MS/MS aplicadas al diagnóstico de ECM comenzaron a ser introducidas hace aproximadamente 15 años e inicialmente se hicieron trabajos de validación clínica de sus posibilidades es decir de su capacidad para detectar situaciones patológicas en pacientes tratados y no tratados, en estudios prospectivos y retrospectivos.

En una segunda fase se han realizado diferentes trabajos de validación analítica en aplicaciones sistemáticas al diagnóstico precoz de enfermedades concretas.<sup>41,101</sup> Como ya se ha comentado, el uso de la dilución isotópica con la MS/MS se ha mostrado muy eficaz desde el punto de vista analítico tanto en sus cualidades para evitar interferencias y ganar sensibilidad como para la eliminación de los errores debidos a la inestabilidad de los equipos. Los límites de detección y cuantificación se encuentran por debajo de los niveles fisiológicos salvo en el caso de algunas AC que circulan a muy bajos niveles.

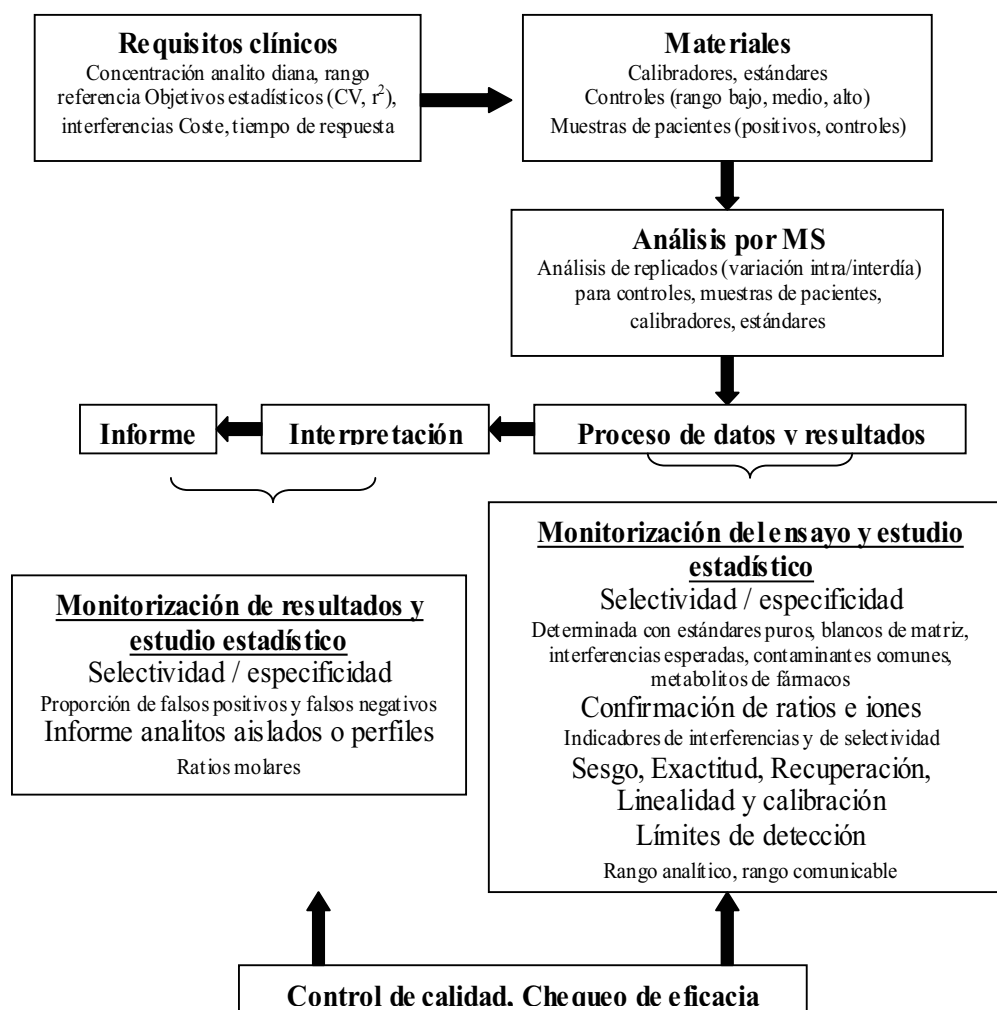
Sin embargo, no tendría sentido abordar la validación de un método analítico dentro del campo del laboratorio clínico obviando los diferentes documentos elaborados por los grupos de expertos del CLSI (antes NCCLS) con recomendaciones y protocolos de validación que se ajustan a los diferentes planteamientos o necesidades de aplicar las denominadas “buenas prácticas de laboratorio” a las técnicas actuales y por supuesto también a la espectrometría de masas en tandem.

Son varias las etapas en el proceso de verificación específico realizado de la técnica de MS/MS y para ellas se han seleccionado tres documentos diferentes: EP15 para los estudios de imprecisión e inexactitud, EP6<sup>69</sup> para el estudio de la linealidad y EP17<sup>70</sup> para el límite de detección.

La verificación de un nuevo método de MS/MS o su puesta al día involucra aspectos relacionados con el análisis estadístico y con el CC que en cierto modo supone un chequeo continuo y una rápida reverificación en cada tanda de análisis. Estos apartados del estudio de un método están interrelacionados entre sí (Figura 56).

## Discusión

Todos los estudios del método se realizaron con un lote de muestras del programa de CC del CDC y por tanto se han restringido a los parámetros incluidos en él y para los que se dispone de unos valores de referencia de concentración con un intervalo de confianza del 95%. Se trata de 4 muestras, una basal y tres incrementadas en su concentración de modo progresivo para todas las AC.



**Figura 56.** Diagrama de flujo donde se puede ver la interrelación entre verificación, validación y control de calidad de un método analítico.

## ***Discusión***

Para el estudio de la precisión y de la exactitud, de acuerdo con el documento EP15, se han realizado experimentos con las citadas muestras, referencias CDC 561 a CDC 564, durante días diferentes y con varias réplicas de cada una de ellas.

El diseño experimental apropiado para demostrar que la imprecisión del método es consistente con la esperada para el método en estudio depende de 4 factores principalmente: (a) el error de tipo I o error “alfa”, que es la probabilidad estadística de rechazar un resultado que es cierto; (b) el error de tipo II o error “beta”, que corresponde con la probabilidad estadística de aceptar un resultado que es falso; (c) el número de niveles de concentración para el que se está evaluando la imprecisión; y (d) el tamaño de las imprecisiones intraensayo y total deseables. Cambios en cualquiera de estos 4 factores afectarán tanto al número de días que debe durar el experimento como al número de replicados requeridos en cada ensayo. En el presente trabajo se realizó un ensayo por día, por lo que el número total de ensayos es igual que el número de días. Se aplicó el mismo diseño para todos los niveles y parámetros estudiados. Se aceptó un 5% de error teórico tanto para la probabilidad de falso rechazo como para la de falsa aceptación de resultados erróneos. El error cometido se relaciona con el número de datos empleados para su estimación. Sin embargo, cuando la imprecisión intraensayo es prácticamente igual que la total (como se observó en este caso), el número de replicados efectuados en cada ensayo y el número de ensayos son de igual importancia. Es destacable que, como la imprecisión fue comprobada a más de dos niveles de concentración, fue necesario ajustar el valor de verificación, Tabla 14 y Tabla 21. El incremento del número de niveles de concentración en el estudio de las características del experimento influyen de tal manera que si se asume una probabilidad de falso rechazo del 5% y se chequean 4 niveles, como en el presente estudio, el experimento tiene una probabilidad individual de falsa aceptación del 7% para un incremento de la imprecisión intraensayo de 3 veces por encima de la deseable. Análogamente, en cuanto a la imprecisión total, el porcentaje de falsa aceptación será menor del 15% para un incremento observado 3 veces superior al deseable. Así, una de las limitaciones del presente protocolo es que sólo detecta desviaciones relativamente grandes con respecto a las imprecisiones deseables. Sin embargo, aunque las características de los sistemas MSMS aplicados al cribado de metabolopatías han sido bien establecidas por el

## Discusión

CLSI no existen en la bibliografía antecedentes de estudios sistemáticos sobre la imprecisión global de los diferentes sistemas utilizados.

En el presente trabajo, se han encontrado imprecisiones válidas para los 4 niveles estudiados de C2, C3, C5 y C16, Tabla 10 a Tabla 13. En el resto de metabolitos, C4, C6, C8, C10, C14 y C5DC, Tabla 15 a Tabla 20, aunque inicialmente se observó mayor imprecisión de la deseable para el nivel más bajo de concentración, sólo resultaron ser estadísticamente significativas las imprecisiones de C6, C10 y C5DC. Sin embargo, esta mayor imprecisión no se consideró clínicamente significativa, puesto que no existe patología asociada a un descenso de concentración en estos parámetros, por lo que no afecta a la calidad del método a efectos prácticos.

C6 y C10 presentaron mayor imprecisión global (no intraensayo) a niveles altos que requeriría una explicación. Se trata de las dos únicas AC que son medidas frente a un IS diferente y en ambos casos se trata de DC8. Una posible explicación es que su comportamiento sea diferente en la fragmentación y que se refleje de forma mas acusada con el aumento de la concentración. Para contrastar esto se requeriría el uso de diferentes IS o realizar un calibrado con patrones de ambas AC lo cual no fue posible por no disponer de ellos aislados.

Para el análisis de la inexactitud se han incluido en todas las tablas el valor asignado por el CDC (valor teórico) y el valor medio de todos los suministrados por los laboratorios participantes y que utilizan nuestro mismo método, derivatizando y sin kit (media RL). Resulta difícil resumir la información obtenida y contrastarla con la manejada porque ambos valores difieren del valor esperado, en relación con el incremento realizado, en función de la AC de que se trate y del nivel de concentración.

Las recuperaciones obtenidas por el grupo de laboratorios que usan el mismo método que el objeto de la presente memoria (memoria de CDC), expresados a través de la pendiente de las correlaciones en función del incremento de la concentración son los siguientes:

C3	C4	C5	C5DC	C6	C8	C10	C14	C16
1.07	0.89	0.98	0.77	0.90	1.07	1.24	1.00	0.89

Si realizámos un cálculo similar con los valores suministrados por el CDC, vemos que siguen la misma desviación pero son todos ellos más elevados con lo que las

## ***Discusión***

recuperaciones mejoran para la C4, C5, C6 y C16 pero empeoran para el resto, y no es posible calcularla para la C5DC por falta de datos.

Los resultados de la inexactitud, que se muestran de la Tabla 13 a la Tabla 20, reflejan desviaciones importantes en % para los valores más bajos de concentración pero que carecen de trascendencia a la hora de hacer su valoración clínica. En los valores medios y altos todas las desviaciones son concordantes tanto con las obtenidas en los valores del CDC como por el grupo de laboratorios que usan nuestra misma técnica salvo en el caso de la C5DC donde son contradictorios y parecen ajustarse más a los valores de estos últimos. Para la C5 y C14 nuestros valores son inferiores y se ajustan por tanto más a las recuperaciones teóricas previsibles en función de los incrementos realizados.

Finalmente, pese a las diferencias observadas, todos nuestros valores se encuentran dentro de los intervalos de confianza suministrados por el CDC y es la C10 la que se encuentra más al límite del citado intervalo.

El estudio de la linealidad, realizado de acuerdo con el documento EP6 del CLSI, aparece resumido en la Tabla 22 y de la Figura 31 a la Figura 39. Se realizó con cinco puntos dado que no se disponía de compuestos puros que permitieran realizar incrementos adicionales a los suministrados por el CDC. Para todas las AC estudiadas los intervalos de linealidad cumplieron el criterio establecido en el margen superior de alcanzar 10 veces los valores fisiológicos. En el rango inferior, se suele utilizar un valor próximo al límite de detección. Asimismo, se utiliza el término “sensibilidad funcional”, que tiene en cuenta la precisión interensayo a muy bajas concentraciones de analito, y se corresponde aproximadamente con el límite inferior de la linealidad que debe ser al menos igual a los valores fisiológicos. En nuestro caso ese valor se corresponde con una dilución a 1/10 de un grupo de muestras consideradas normales por lo que aún en los valores más bajos, donde se aproxima mucho al blanco analítico, dicho valor está garantizado.

Como se puede ver en la Tabla 22, los coeficientes de correlación estuvieron siempre por encima de 0.99 y las pendientes se corresponden con las recuperaciones ya comentadas en el apartado de la exactitud. Todas ellas en márgenes aceptables próximos a 1 salvo en el caso de la C10, donde se producen valores claramente elevados, y la C5DC, con valores bajos, tal como ya se indicó y se reflejaba en el conjunto de resultados suministrados al

## ***Discusión***

CDC. Los intervalos de confianza que aparecen en la misma tabla para las pendientes ponen de manifiesto que se trata de un método muy reproducible y robusto.

El cálculo de los límites de detección y cuantificación, realizado de acuerdo con el documento EP17, aparece resumido en la Tabla 23. Fue necesario recurrir a una dilución 1/10 de las AC extraídas a partir de la muestra basal del CDC para poder hacer una aproximación al valor real de dichos límites.

Como se pudo observar en función del sesgo del límite de detección y de su valor, se puede considerar igual al de cuantificación y todos los valores son muy inferiores al percentil 50 que aparece en la Tabla 39 con los valores de AC para el grupo considerado de referencia en el presente estudio. En general los límites de cuantificación obtenidos están por debajo del percentil 1 que aparece en dicha tabla salvo para la C6, C10 y C5DC, que son del mismo orden.

### ***4. Estudio para la introducción de nuevos IS de AC***

El acoplamiento LCMSMS requiere del uso de IS, que son añadidos a todas las muestras de una serie estrictamente en la misma cantidad y permiten la cuantificación basada en el ratio, de áreas o de “cps”, del compuesto objeto de estudio frente al IS sobre la base de asumir que tienen igual respuesta. Sin embargo, las condiciones de ionización, y en consecuencia de fragmentación, pueden sufrir variaciones en pocos segundos y, para que su impacto sea despreciable, debe ser similar sobre ambos compuestos, lo que requiere que posean una estructura molecular lo más parecida posible. Esto es perfecto cuando se usan IS que son el mismo compuesto pero, en los que se han sustituido átomos de hidrógeno por deuterio o  $^{12}\text{C}$  por  $^{13}\text{C}$ , sólo hay unas pocas unidades de masa de diferencia, de modo que su comportamiento es idéntico y la precisión y exactitud de las medidas son óptimas. Alternativamente, se recurre a moléculas homólogas pero su comportamiento debe ser contrastado y no pueden ser componentes endógenos de las muestras. En última instancia se recurre a expresar los resultados como ratios de picos, tomando como referencia uno estable tanto desde el punto de vista del análisis como de su concentración en las muestras. Por lo tanto, disponer de IS adecuados se convierte en un paso crucial en el desarrollo de un método por LCMSMS.<sup>102</sup>

## ***Discusión***

La situación ideal es tener un IS para cada analito de interés. Sin embargo, esto no es posible y sólo hay IS comercialmente disponibles para algunos analitos. En el caso de las AC existen bastantes marcadas isotópicamente pero muchas tienen una estabilidad limitada, tanto sólidas como en disolución, incluso en condiciones especiales de almacenamiento. Otro problema es la hidrólisis de algunas AC en disolución, que impide su uso y obliga a recurrir al marcaje en la estructura carbonada en vez de en los grupos metilo.<sup>103</sup>

La síntesis de este tipo de compuestos es relativamente sencilla<sup>104</sup> a partir de la carnitina, y ello ha propiciado que varios laboratorios de síntesis orgánica de hospitales o universidades (Universidad Autónoma de Madrid, Hospital Universitario de Ámsterdam) ofrezcan algunos de estos compuestos aunque a precios muy elevados pese a las bajas cantidades requeridas. De forma paralela, el catálogo de AC y de otros metabolitos de las principales formas comerciales se ha incrementado notablemente desde que se ha generalizado su uso por espectrometría de masas en tandem.

Así pues, en los métodos donde se trabaja con perfiles, que incluyen un elevado número de compuestos a valorar, se recurre a introducir el mayor número posible de IS de modo que cubran en su totalidad el rango de longitud de las estructuras de los compuestos de interés. Con este planteamiento, en el análisis de AC en sangre se utilizaron AC marcadas desde C0 a C16, disponibles comercialmente, si se desea, en forma de una mezcla en un vial liofilizado pero que no incluyen algunas de cadena media, larga y muy larga. En concreto no incluyen C6, C10, C12 y C18. Como consecuencia los resultados de estas carnitinas deben referirse a otras, lo que conduce a posibles errores de cálculo. Esta fue la razón de intentar introducirlas en la mezcla de patrones marcados isotópicamente.

Se estudió la pureza isotópica de los compuestos adquiridos, la cual resultó ser superior en todos los casos al 95% (95.4 a 99.9) (Tabla 25) y equivalente a la de los IS usados habitualmente (Tabla 24). Esta pureza es mayor cuanto más larga es la estructura y los resultados permitieron concluir que los compuestos eran adecuados para su inclusión.

Se estudiaron, a continuación, las purezas relativas cruzadas respecto a los IS usados y el contenido de AC no marcadas para ver su aportación y la posible distorsión del cálculo por ambas aportaciones. Por un lado, por ser diferente la concentración total resultante de IS y, por otro, por aportar componentes endógenos, con el consiguiente aumento de ruido y



## ***Discusión***

distorsión de los rangos de referencia a concentraciones bajas. La contribución resultó ser de importancia, con aportaciones superiores al 5%, para C2, C3, C5 y C8, Tabla 26, tanto en los IS como en las AC no marcadas.

A continuación se hizo un estudio de lo que supondría la inclusión conjunta sobre los valores de AC en muestras de sangre reales y resultaron ser, Tabla 27, muy diferentes C2, C3 y C16, además de las diferencias ya esperadas en las nuevas introducidas en función de su cálculo frente a los nuevos IS. Estos resultados hicieron desaconsejable su inclusión como disolución conjunta.

Se probó entonces la posible inclusión de los nuevos IS de forma individual y se hizo un estudio comparativo de los efectos según se sumaran dichas disoluciones, frente los IS habituales, de CIL, o a la disolución conjunta inicial, Tabla 28, Tabla 29 y Tabla 30, son numerosas las interferencias cruzadas que se detectan y resultan menores los aumentos derivados de C6 (en C16 y C16:1 y en los IS de C2, C3 y C5) y C12 (C0, C16 y C14:1 y en los IS de C2, C3, C4 y C5). Para los otros dos, son muchas pero muy significativas las producidas sobre C16 por el IS nuevo C10 y del C18 sobre C0 y C16 igualmente con lo que solo podría ser abordable, en principio, la inclusión de los dos primeros.

Finalmente, se realizó un estudio con muestras control del CDC para ver el efecto de su introducción sobre los resultados de las concentraciones, conocidas también para C6 y C10, finales medidas de todas las AC, Tabla 31, Tabla 32 y Tabla 33. Como era de esperar, fueron numerosas las interferencias detectadas en los resultados, siendo las de mayor trascendencia las producidas sobre C3, C8 y C18 y en menor medida sobre C4 y C14. Con relación a los valores para C6 y C10, según se cuantifiquen frente a DC8 o a los nuevos IS, los resultados se adjuntan mejor sobre todo a concentraciones elevadas y mejores en el caso de C10, aunque alterando de forma importante C16, que de C6.

Una vez revisados los resultados de todas las experiencias anteriores se concluyó que su inclusión requeriría del cálculo de nuevos rangos de referencia para las AC en sangre y, puesto que el beneficio a obtener era solo parcial, se decidió no realizarla.

### ***5. Estudio de los rangos de referencia de AC en sangre***

La posibilidad de abordar el diagnóstico precoz de ECM por MS/MS nos llevó a la necesidad de establecer nuestros propios rangos de referencia para, a partir de ellos, tomar decisiones respecto a las posibles enfermedades a detectar.

Existen además bastantes publicaciones<sup>105,106</sup> que recomiendan la suplementación con carnitina en los recién nacidos y esta debe ser basada en el conocimiento de los valores normales tanto de la carnitina total como de la carnitina libre y las AC.

No existe consenso sobre el protocolo a seguir para obtener estos “valores normales” y, tras el trabajo pionero de Novack et al,<sup>107</sup> se considera el trabajo de Rashed et al. como un interesante punto de partida tanto por su planteamiento pionero en la introducción del uso de algoritmos apoyados en el uso de sistemas informáticos, el denominado CAMPA, como por la información que suministró en unos años iniciales del trabajo de cribado neonatal por MS/MS que se caracterizaban por la ausencia total de información.

Las AC se miden de modo individual frente a un IS y ello permite obtener resultados cuantitativos. Cuando no se dispone de un IS y se recurre al ratio frente a otro de masa similar, los resultados pueden verse afectados en su exactitud aunque no en la precisión. Los valores de referencia que se manejan son, por lo general, los valores límite superiores observados en un grupo elevado de individuos aparentemente sanos, y se suelen corresponder con el percentil 99 ó 99.5 de la población sana. Solo se manejan intervalos para la carnitina libre y la acetilcarnitina. Los valores de las AC en sangre son diferentes a los correspondientes en plasma o suero y por lo general de difícil extrapolación entre diferentes laboratorios, lo que hace necesario una adecuada interpretación por los profesionales de cada laboratorio.<sup>108</sup>

Es un hecho conocido que los valores de las AC y la carnitina libre son significativamente más elevados en sangre que en plasma<sup>109,110,111</sup> debido a la mucho mayor concentración de AC de cadena larga en las membranas de los eritrocitos. Los niveles de AC en plasma muestran, sin embargo, unos patrones de alteración, en caso de presencia de una enfermedad, similares a los de la sangre.

Los primeros días de vida son una etapa caracterizada por un intenso metabolismo de los ácidos grasos, con lo cual las concentraciones en sangre de los metabolitos relacionados,

## ***Discusión***

como AC, ácidos orgánicos o AA, pueden variar de forma importante con la edad. La mayoría de los valores de referencia de AC disponibles provienen exclusivamente de recién nacidos sanos y pueden por tanto ser insuficientes tanto por su menor precisión diagnóstica como por ser inadecuados para el seguimiento de pacientes con ECM.

Las variaciones de los niveles de las AC con la edad no han sido sistemáticamente estudiadas, pero los programas de cribado neonatal han permitido constatar que las concentraciones sanguíneas de carnitina y algunas acilcarnitinas son más altas en los primeros días de vida y disminuyen rápidamente en las primeras semanas. A modo de ejemplo, en la carnitina libre y la total esta diferencia puede ser hasta del 50% cuando se comparan los valores de las primeras 48 horas de vida y los de una semana<sup>111,112</sup> y esta variabilidad hace que se adopten distintas estrategias en la detección de las alteraciones incluidas en los programas de cribado neonatal, vinculadas a la medida de perfiles de acilcarnitinas en sangre, en función de la edad en el momento de la toma de muestra. La precisión de la prueba disminuye cuando no se trata de población neonatal, y puede ser aconsejable recurrir a pruebas complementarias, como el estudio de ácidos orgánicos en orina.

Para el estudio de rangos de referencia se han utilizado los resultados de AC en sangre obtenidos en las más de 112000 muestras analizadas. Puesto que dichas muestras se corresponden con la práctica totalidad de los recién nacidos de nuestra área geográfica, los valores serán “de toda la población” y por tanto desde el punto de vista estadístico poseen una gran fortaleza y no parece necesario discutir el grado de confianza que acompaña a su cálculo.

Aunque desde el punto de vista práctico muchas de las comparaciones realizadas entre los diferentes grupos poblacionales tengan una significación estadística de la que es difícil analizar su trascendencia, se ha seleccionado una presentación de percentiles desde el 1 al 99.99 con el fin de no perder información y hacer una comparación de distribuciones lo más completa posible.

En los análisis de AC realizados se recogen los parámetros que aparecen en la Tabla 34 y se ha utilizado para los estudios de grupos la información poblacional disponible de cada muestra y que se corresponde con los campos que aparecen en la misma tabla. Los valores de algunas de las AC registradas se desearon por considerar que carecían de interés con

## ***Discusión***

la información disponible en la actualidad y sin embargo complicaban aún más el ya elevado volumen de información manejado.

Una parte de los parámetros registrados tiene un interés exclusivamente analítico y de control del trabajo diario y han sido utilizados con este fin los valores de intensidad de los picos de los IS. Dichos valores son registrados en “cps” y se establecieron puntos de corte mínimos de dicha intensidad por considerar que, en ese caso, o bien se había producido un error de manipulación o las condiciones instrumentales se habían deteriorado hasta el punto de que hacían no fiables los resultados obtenidos. Los valores utilizados como filtro de los resultados entre los años 2000-02 fueron: d9C1 <1000 o d3C8<400 o d3C16<1000 o d9C14<800 cps. A finales de 2002 se produjo por parte del servicio técnico un reajuste en el espectrómetro de masas que permitió aumentar notablemente la sensibilidad y entre 2003-05 se eliminaron los perfiles de las muestras si: d9C1 <2000 o d3C8<800 o d3C16<1500 o d9C14<1400 cps.

En la práctica no se han registrado muchas alteraciones de este tipo y su efecto es casi nulo debido a que el reanálisis obligatorio de las muestras afectadas conduce por lo general a una alternativa de resultados válida. Este mismo criterio fue utilizado de forma general con todas aquellas muestras que requirieron una confirmación analítica de los resultados, previa a la decisión de solicitar o no una nueva muestra de sangre que permitiera continuar los estudios iniciados.

De forma general, se tomó el criterio de dar por válidos los resultados correspondientes a las muestras registradas como “muestra escasa” por ser una práctica habitual del laboratorio analizarlas pese al reducido tamaño de la mancha de sangre recibida. Dichas muestras suponen entre un 1 y un 2 % del total y aunque esta decisión conlleva un pequeño sesgo estructural en los resultados globales responde mejor a la realidad cotidiana del material con el que se trabaja.

Las muestras registradas como “poca muestra” fueron, sin embargo, rechazadas porque conllevan un error de volumen de muestra que hace inservibles los resultados a efectos poblacionales, aunque en caso de presencia de patología puedan ser de utilidad. Dichas muestras generan de forma automática una solicitud informatizada de nueva muestra y estas segundas muestras son una parte importante de los grupos finales de edad superior a la recomendación de fecha de toma de las muestras en los primeros días de vida.

## ***Discusión***

Durante el período de trabajo, de más de cinco años, que incluye la presente memoria, se produjo un cambio en el tipo de papel de fibra de algodón utilizado para la recogida de las muestras. En los dos primeros años se utilizó el S&S 2992 (Schleicher and Schull, Dassel, Alemania) y posteriormente se cambió al S&S 903. Puesto que, como aparece reflejado en los correspondientes certificados suministrados por el fabricante, existe una diferencia importante en el volumen de sangre por unidad de superficie que conlleva, fue necesario registrar el papel utilizado y aplicar un factor corrector a dichos resultados durante el tiempo de convivencia de ambos tipos de papel.

Para el establecimiento de los grupos de edad se ha tenido en cuenta que fueran representativos de los posibles cambios asociados al crecimiento y a la alimentación pero dando especial relevancia a la primera semana de vida que es donde se concentran la mayor parte de las muestras (Tabla 35 y Tabla 36).

Para el análisis de los numerosos estudios de correlación realizados nos centraremos en los valores de los percentiles 99 y 99.5 por ser los más representativos de cara al uso de las tablas obtenidas y solo en algún caso en el percentil 1.

Como se puede ver en la Tabla 39 y sucesivas, el perfil normal de AC en sangre consiste mayoritariamente en carnitina libre, acetilcarnitina y a distancia y con valores crecientemente mas bajos C3, C4 (mezcla de butiril e isobutiril carnitinas), C5 (mezcla de isobutiril y metilbutiril carnitinas), C4OH, C5OH y típicamente cantidades mucho menores de las otras con la excepción de C16 y C18:1 (y C18 en menor medida). La baja concentración presente de muchas de las AC hace que, a efectos de analizar diferencias, poco útiles muchos de los valores que se acompañan.

En la Tabla 39b aparecen un número importante de ratios de AC que son utilizados habitualmente como indicadores inducidos en el diagnóstico de ECM por reflejar de forma muy importante e incluso mejor los cambios que se puedan producir en sus niveles. No existen, sin embargo, rangos de referencia en la literatura con los que se puedan establecer comparaciones.

Esta primera distribución se ha hecho con el grupo de muestras provenientes de recién nacidos de menos de 8 días de vida, casi 93000. Los valores que se obtuvieron concuerdan en general con los publicados por Millington y Cavedon, aunque han sido obtenidos en un

## ***Discusión***

grupo diferente, y en los casos en que existen diferencias los valores presentados en la presente memoria son en general ligeramente más bajos.

Un paso adelante en el análisis de los valores de referencia de AC en sangre y los posibles cambios que sufren es su análisis en función de las variables más importantes en el momento del nacimiento y estas son el peso, la alimentación y la edad gestacional. Los cambios en función de la edad serán considerados aparte por ser los de mayor trascendencia.

Se han establecido cuatro grupos posibles en cuanto al peso: menor de 1500g, es decir grandes prematuros, que son considerados siempre de forma independiente por los problemas de inmadurez de todo tipo que conlleva el bajo peso al nacimiento, menor de 2500g, entre 2500 y 4100g que será el grupo mayoritario y el considerado de peso “normal” y mayor de 4100g.

Se ha realizado el análisis de forma que se reflejen todas las diferencias significativas que existen en las distribuciones entre todos los grupos. De este modo aparecen AC que muestran diferencias solo entre dos o entre tres o entre todos los grupos y estas aparecen reflejadas en las Tabla 41 a Tabla 45.

De modo global, puede afirmarse que estas diferencias que reflejan nuestros valores no corroboran la tendencia hacia valores crecientes con el peso que han sugerido Meyburg et al.<sup>113</sup> y que sería un reflejo del aumento de las reservas titulares de carnitina con el peso y la masa muscular.<sup>109,114</sup>

En la Tabla 40 aparecen aquellas únicas 5 AC en las que no se han observado diferencias en función del peso al nacimiento y que las de cadena muy larga mayoritarias, C16 y C18:1, y algunas de sus OH derivadas. Entre las diferencias observadas, son de resaltar las diferencias en C0 a partir de 2500g reflejo sin duda de la presencia de carnitina como suplemento en las alimentaciones especiales para bajo peso al nacimiento, Tabla 42, y que debe ser causa también de los aumentos reflejados en la Tabla 43 en C2 y C3 y algunas de las de la Tabla 45. El importante aumento de C5 que aparece reflejado en la Tabla 44, 1.30  $\mu\text{M}$  para el percentil 99.5 por debajo de 2500g frente a 0.87 en los grupos por encima de este peso, debe sin embargo ser consecuencia de la terapia antibiótica que muy frecuentemente reciben los recién nacidos de muy bajo peso en las unidades neonatales.

## ***Discusión***

Puesto que parece clara la distorsión que supone la inclusión del grupo de recién nacidos de muy bajo peso, y en menor medida los de muy alto peso, cara a la obtención de rangos de referencia “normales”, se seleccionó de este grupo de edad menor de 8 días solamente aquellos cuyo peso al nacimiento estuvo comprendido entre 2500 y 4100g y se realizó de nuevo el mismo estudio de forma que en la Tabla 46 aparecen los percentiles globales para todas las AC y en la Tabla 47 agrupados en función de los dos grupos de peso al nacimiento iniciales incluidos. En el primer caso las diferencias son mínimas debido al elevado tamaño del grupo estudiado pese a la selección realizada y en lo referente al peso persisten las diferencias casi iguales en C0, C2 y C3 y aparecen otras nuevas que no existían en el grupo global en C16 y sobretodo en C18:1 que anteriormente no mostraban ninguna diferencia con el peso.

En cuanto a las posibles diferencias según el tipo de alimentación, se han establecido tres grupos: artificial, materna y mixta y se ha repetido el estudio a partir de los grupos realizados en cuanto al peso en el apartado anterior. En las Tabla 49 a Tabla 53 aparecen con todos los grupos y en la Tabla 54 en el comprendido entre 1500 y 4100g.

Se ha encontrado que las diferencias son significativas entre todos los grupos menos entre materna y artificial o mixta en C6, C8, C18OH, C18:1 y C5:1, es decir prácticamente todas. De entre las muchas diferencias significativas observadas, son pocas las que parecen aportar alguna perspectiva nueva. Los vínculos entre el tipo de alimentación y el peso quedan reflejados en la proporción de los que reciben alimentación artificial entre los de peso por debajo de 2500g, el 45,6%, y en el de mas de 2500g solamente es el 26.3% y era previsible que persistieran las diferencias mayores en C0, C2 y C3 entre el grupo de bajo peso y alimentación artificial que entre el mismo pero de peso por encima de 2500g. Aparecen otras pequeñas elevaciones en C12 y C14:1 en la alimentación materna, que carecerían de explicación a partir de la variable alimentación. Sí parece importante la elevación que se produce en C16 con la alimentación materna y que queda reflejada en ambos grupos de peso, 4.9  $\mu$ M frente a 5.5 para el  $p_{99}$ . Finalmente, persisten, e incluso se acrecientan en el grupo de muy bajo peso y alimentación artificial, las diferencias en C5 lo que reafirma la vinculación entre medicación y su elevación (Tabla 52).

Las diferencias anteriores se mantienen, aunque ligeramente matizadas, cuando se realiza el análisis en el grupo con pesos entre 1500 y 4100 solamente. Persisten las elevaciones en

## ***Discusión***

C0, C2 y C3 vinculadas a la alimentación artificial y se mantienen los valores mas altos para C10, C12, C14:1, C14 y C16 en caso de alimentación materna y, sin embargo, más bajos en C18:1. Para C5 las diferencias en el grupo de 1500 a 2500 son mucho menores y sólo persiste la elevación por encima de 2500g en el caso de alimentación artificial o mixta.

Finalmente, antes de pasar a estudiar la evolución de los niveles de AC con la edad, se ha realizado un pequeño estudio de posibles cambios de las AC vinculados al sexo, tal como ha sugerido Cavedon aunque sin aportar datos experimentales. Se han encontrado diferencias significativas en algunas AC de cadena muy larga y son de resaltar las encontradas para C14, C16 y C18:1 (Tabla 55).

Para el estudio de la evolución de los niveles de AC en función de la edad se han establecido los grupos que pudieran reflejar los cambios que se produzcan pero también que respondieran a la práctica del diagnóstico precoz de ECM a partir de los programas de cribado. Como ya se ha dicho anteriormente, existen pocos estudios longitudinales<sup>106,112,115</sup> del metabolismo de la carnitina durante el período neonatal y primera infancia y los grupos establecidos por nosotros han pretendido cubrir de la mejor forma posible estas etapas. En las Tabla 56 y Tabla 57 aparecen los valores de todas las AC estudiadas en los grupos establecidos y en la Tabla 58 los valores de los ratios entre AC.

Puesto que la toma de muestra se realiza en la actualidad a partir del tercer día de vida, y antes del año 2003 entre el 5º y 8º, este grupo de muestras que se encuentra por debajo de 8 días de vida es claramente mayoritario al suponer mas del 83% de ellas.

Es un hecho conocido que durante el período neonatal se producen importantes cambios en el metabolismo de la carnitina y de los ácidos grasos.<sup>116,117</sup> Estos cambios son respuesta al stress que supone el nacimiento y al cambio en la dieta que supone la leche al aportar más del 90% de la grasa en forma de triglicéridos ricos en ácidos grasos de cadena larga<sup>118</sup> y se han constatado diferencias claras entre los niveles de AC en la sangre de cordón y al 5º día de vida. Tratando de profundizar en estos hechos, en la Tabla 56 aparecen desglosados los valores de los percentiles, a los niveles de decisión, de todas las AC en la primera semana de vida día a día.

Tomando como base del análisis el p99, que se ve menos afectado por el menor tamaño de los grupos del día 0 y día 1, se puede ver que los valores de varias AC aumentan a partir



## ***Discusión***

del nacimiento y que esta tendencia comienza a invertirse a partir del 4º o 5º día de vida. Esta tendencia es clara en C2, C3, C16 y C14:1, donde los valores permiten visualizarla bien, y se observa también, aunque con dificultad por los valores manejados, en otras que aparecen a más bajos niveles de concentración. No parece que se produzcan cambios, sin embargo, en la carnitina libre, en la C5, en las AC dicarboxílicas y algunas otras. Aunque no sean cambios importantes existen algunas AC para las que los niveles parecen descender desde el nacimiento. Esta disminución se observa en la C14 y C18, por ejemplo, y parece producirse también en alguna aunque, nuevamente por su baja concentración, se hace difícil corroborarlo.

Estas tendencias observadas a partir de los percentiles de corte quedan reflejadas de forma más clara en las Figura 43 a Figura 47 que se han incluido en el apartado siguiente del capítulo de resultados. Para la carnitina libre, Figura 43, los niveles se mantienen constantes y lo mismo para la C5, Figura 46. Para la C2, C3 y C16 se produce una elevación clara durante los primeros cinco días de vida y una disminución pronunciada a partir de ese momento tal como se aprecia en las Figura 44, Figura 45 y Figura 47. Estas importantes elevaciones producidas durante los primeros días de vida unidas al mantenimiento de la carnitina libre corroboran la apreciación de que una disminución de la disponibilidad de esta, en la etapa neonatal, puede limitar la oxidación de los ácidos grasos y ser potencialmente peligroso en situaciones de alta demanda energética como puede ser una septicemia.

Para completar el estudio longitudinal, se ha hecho una comparación de las distribuciones de los 8 grupos de edad establecidos en total. Desde el de la primera semana de vida hasta el de más de un año. En la Tabla 57 aparecen, en sucesivas etapas, todas las diferencias encontradas que poseen significación estadística. Cuando no existieron dichas diferencias los grupos de edad se han englobado en uno mayor y esta es la causa de las diferencias entre las partes de dicha tabla.

La primera semana de vida es diferente respecto a las siguientes para todas las AC y este hecho es quizá el de mayor relevancia.

A partir de esta primera semana, y hasta alcanzar el mes de vida, se produce por un lado la disminución de un grupo importante de AC que incluiría a la C2, C3, C4, C14, C14:1, C16, C18, C18:1 y en menor medida la carnitina libre y tiene lugar en casi todas ellas en la

## ***Discusión***

primera y segunda semanas de vida para en las otras dos apenas variar. Por otro lado está otro grupo grande de AC en las cuales no se producen cambios apreciables durante este período y en el estarían las dicarboxilicas, las OH derivadas de cadena media y larga y alguna de cadena media con insaturaciones como la C10:1. Un caso aparte es la C5, que sufre una elevación importante en la segunda semana de vida para después disminuir de forma gradual.

A partir del primer mes de vida, la mayoría de las AC no varían o lo hacen muy ligeramente como es el caso de la C8 y C8:1 con lo que es difícil valorarlo. Sin embargo, en un número pequeño de ellas si que hay cambios importantes. La primera es la carnitina libre que aumenta muy claramente pues pasa el percentil 50 de 17.76  $\mu\text{M}$  en las semanas 3 y 4 a 20.98  $\mu\text{M}$  en el segundo mes de vida. Otras carnitinas que sufren un aumento claro son la C2, C3 y C4, que podrían ser vinculados al de la carnitina, y la C14:1, C18:1 y C18:2.

Finalmente hay dos, la C4DC y la C5OH, que tienen el aumento más claro de todas. Como puede verse en la Figura 42e, en ambos casos es muy pronunciado el aumento a partir de 3 meses de vida.

Aunque se verá con más detalle en el apartado de los puntos de corte, en las Figura 42a a Figura 42e aparecen representadas gráficamente las evoluciones del percentil 99 de varias AC importantes con la edad.

En la Tabla 58 se ha hecho un estudio de la evolución de los principales ratios de AC con la edad de acuerdo con los 8 grupos establecidos. Tal como era de esperar, por los valores de las AC referidas, se producen importantes cambios en muchas de estas relaciones y es por ello de mucho interés conocerlas para un laboratorio que no solamente trabaja con muestras neonatales y que frecuentemente recurre a ellos por su potencia para detectar cambios. En general, en aquellos en que hay cambios, se produce un importante aumento con la edad y en esta situación están: C8/C2, C3DC/C4OH, C5DC/C16, C3/C16, C4/C3, C5OH/C8, C8/C10, C14:1/C16 y C16OH/C16. En algún caso con cambios muy pronunciados. No fue posible hacer un análisis crítico de estos datos, mas allá del que se derivaría de nuestra propia experiencia y que ya se ha hecho en las AC por separado, por no existir referencias en la literatura de estudios longitudinales con los ratios de AC.

## ***Discusión***

A modo de resumen, de la evolución de las AC con la edad se puede decir que son muchos los cambios observados y que por lo general concuerdan con los pocos datos publicados hasta ahora.<sup>112,119</sup> En la práctica clínica, muchas de estas diferencias sólo cobran relevancia en los casos en que el punto de corte diagnóstico está muy próximo al intervalo de referencia como puede ser el caso, que corrobora nuestra experiencia de más de seis años de trabajo, de la aciduria metilmalónica que puede ocasionalmente presentar muy ligeros incrementos de las AC de cadena corta y en que la C4DC puede ser incluso normal. En el caso del diagnóstico de la LCHAD y el déficit de proteína trifuncional, pueden aparecer casos con muy ligeras elevaciones de las AC de cadena larga y, si se observa en concreto la C16, cuyos valores permiten seguir con claridad la evolución, se puede ver que desde las primeras semanas hay una disminución del orden del 40%.

Los rangos de referencia ajustados a la edad son también útiles en la investigación de las formas silenciosas de ciertos ECM, pues en ellos suelen producirse sólo ligeras elevaciones de las AC salvo que se encuentren en situaciones críticas o de ayuno prolongado.<sup>120,121</sup>

Los cambios observados en los rangos de referencia son de gran utilidad cuando se trata de realizar un diagnóstico en un niño mayor bien alimentado y con estado general bueno, pues, en ese caso, esas diferencias pueden cobrar importancia. Sin embargo, en muchas de las patologías buscadas, como IVA, PA, CPT II y, por lo general, también en la MCAD, las pequeñas diferencias estadísticamente significativas que se refieren en este apartado no afectan a su diagnóstico por aparecer con incrementos muy marcados en las AC respectivas.

Existen algunas situaciones o condiciones que pueden hacer variar de forma importante las concentraciones de las AC. Los pacientes que reciben un suplemento de carnitina o una leche suplementada, de las varias que existen en la actualidad en el mercado, tienen un marcado incremento además en C2, C3 y otras AC dentro de un perfil que podemos considerar inespecífico unas veces e ininterpretable otras.

Estas alteraciones de las AC son muy frecuentes en la C2 que se puede ver afectada en las situaciones de ayuno por el aumento de la producción de acetyl-CoA intramitocondrial,<sup>108</sup> al igual que la C4OH, pero también por una interferencia debida al ácido glutámico. En la Tabla 73 se presentan algunas de estas alteraciones a partir de diferentes datos de la bibliografía.<sup>108,111,112</sup>

## Discusión

Estas alteraciones o interferencias según los casos de los perfiles de AC, así como otras menos específicas que frecuentemente presentan los pacientes en situaciones de crisis, pueden afectar a la interpretación diagnóstica de los resultados de AC si no son informados desde una perspectiva experimentada.

Causa de la alteración	AC involucradas	Cambio observado
Suplemento de MCT	C8, C10 (menos C6DC)	Aumento
Dieta cetogénica	C2, C4OH	Aumento fuerte
Aceites de oliva, girasol, etc.	C14:2	Aumento
Situaciones de ayuno	C2, C4OH	Aumento
Acidosis láctica	C2	Aumento
Acido valproico	C8, C10	Aumento
Benzoato	C0	Disminución
Antibióticos	C5	Aumento elevado
Diálisis renal	C0	Disminución
Procesos Hemolíticos	C3	Aumento
Varios fármacos	C8, C10, C10:1, C14:1, etc.	Aumento

**Tabla 73. Alteraciones en los niveles de AC en sangre producidos en diferentes situaciones no patológicas respecto a ellas.**

Puesto que, como ya se ha citado, el suplemento de carnitina puede afectar de forma importante a los valores de muchas AC, y no es posible conocer que se produce más que a partir de los resultados, se ha realizado un estudio acerca de esta posible distorsión haciendo un corte de los resultados de las muestras del grupo mayoritario de <8 días, y ya seleccionado en función de los pesos entre 1500 y 4100g, y se han eliminado aquellas que presentaban valores de C0 por encima de su propio percentil 99. Los resultados aparecen en la Tabla 59 y, aunque afectan de forma notable solo a C0, C2, C3 y C16, al compararlos con los recogidos en la Tabla 39 y la Tabla 46, se corresponderían con los valores de referencia mejores para el grupo de población estudiado.

Aunque se trata de un dato del que solo disponíamos para en torno a un 30% de las muestras, se ha realizado un estudio de la posible influencia de la edad gestacional sobre los valores de AC en sangre. En la Tabla 60 se muestran los resultados agrupados en

## ***Discusión***

función de que se refieran a embarazos de menos de 38, hasta 42 o de más de 42 semanas de gestación, aunque este último grupo es muy reducido y no es útil a efectos de valoraciones. Tal y como podría esperarse, una vez hecho el análisis por peso al nacimiento, aparecen importantes diferencias entre los dos grupos citados para C0, C2, C3, C4, C5 y C18:1 en que los valores son más elevadas en el grupo de menor EG y a la inversa en C4OH, C4DC y C18:2 y en el resto no se producen cambios o estos son indetectables en función de los bajos valores de concentración manejados. En la literatura existen datos contradictorios acerca de los cambios que se producen en los niveles de carnitina en la sangre fetal durante las últimas semanas de la gestación.<sup>113,122</sup> De nuestros resultados podría concluirse una leve asociación entre prematuridad y niveles más elevados de carnitina libre y AC de cadena corta. Con el fin de analizar un poco más en profundidad estos resultados, se han agrupado los de EG normal en función del peso al nacimiento inferior a 2500g, es decir con retraso del crecimiento intrauterino, y superior a 2500g, Tabla 61, y los resultados parecen más claros hacia valores altos en el caso de bajo peso y carnitina libre y AC de cadena corta.

Todos estos resultados, así como los encontrados asociados al bajo peso directamente y que ya han sido comentados, parecen corroborar la tesis propuesta por Penn et al<sup>123</sup> de que la reducción de la masa muscular o la inmadurez en los sistemas de transporte de carnitina conducen a una menor concentración de carnitina en los tejidos y a un aumento de los niveles de AC en sangre.

### ***6. Estudio de los puntos de corte diagnósticos para las AC en sangre***

Cuando se trabaja en el diagnóstico precoz de ECM con un planteamiento de cribado, se definen como puntos de corte los niveles de decisión a partir de los cuales los resultados de una prueba se consideran presuntamente positivos, o fuera de límites, si los superan y presuntamente negativos, o dentro de límites, si no lo hacen.

En el establecimiento de los puntos de corte se deben tener presentes algunas recomendaciones generales. La principal se deriva de que el objetivo de un cribado metabólico es que no se produzca ningún falso negativo (sensibilidad 100%) y ello se logre

## *Discusión*

con el menor número posible de falsos positivos (especificidad lo mas próxima posible al 100%). De acuerdo con lo anterior, estos puntos de corte para los metabolitos diagnósticos se situarán en valores intermedios entre los que presenta la población de referencia y los del grupo patológico. Surge así la primera y más importante dificultad para fijar dichos puntos, pues en el inicio del trabajo por MS/MS era imposible disponer de dicho grupo patológico ya que hasta ese momento no se realizaba el diagnóstico de dichas enfermedades. Para alguna de las enfermedades, se disponía de algún paciente mayor pero los niveles que presenten dichos pacientes no son transferibles a la etapa neonatal y sin tratamiento alguno que los modifique.

Con el fin de establecer unos puntos de corte iniciales, decidimos analizar un grupo representativo de recién nacidos y tomar como primer valor el p99 de dicho grupo. Para que los resultados sean fiables se necesitan analizar al menos 2000 muestras y eso fue lo que se hizo. En similar situación, otros laboratorios<sup>38,39,124</sup> han tomado decisiones parecidas pero estableciendo el límite en 4DE por encima de la media. Sin embargo, nuestros resultados, para este primer grupo, demostraron que las distribuciones no eran gaussianas, sino que presentaban gran asimetría, y lo más correcto era trabajar con percentiles.

Sin embargo, el establecimiento del punto de corte en este percentil es muy conservador y, en el caso de una prueba múltiple como la MS/MS, conduce a un número muy elevado de valores que es preciso confirmar, al considerar como potencialmente anómalos el 1% de ellos para cada uno de los parámetros incluidos.

Se decidió, además, trabajar con dos niveles de decisión: uno para los valores en torno al punto de corte y que no implicase por parte del laboratorio ninguna actuación urgente, al cual llamamos valor de alerta, y otro por encima del cual los resultados pudiesen ser clasificados claramente como indicativos de presencia de patología. Llegamos así al planteamiento con el que comenzamos a trabajar en el año 2000 y que se sigue manteniendo. Existe un primer punto de corte, situado en el p99, que es interno del laboratorio y que denominamos como de “reanálisis”, lo que implica solamente la repetición de la prueba sobre la misma muestra. El segundo punto de corte sería el que implica el primer nivel de decisión, situado en el p99.5, y conlleva, además de la repetición de la prueba para la confirmación del resultado, la repetición de ésta sobre una nueva muestra que será necesario solicitar. El tercer percentil utilizado se corresponde con el

## ***Discusión***

segundo nivel de decisión, está fijado en el 99.9, y conlleva, además de lo anterior, una actuación urgente por parte del laboratorio.

Estos puntos de corte fueron modificados periódicamente a medida que se fueron analizando muestras hasta alcanzar 10000 y una vez llegado a este número se esperó a tener otras 10000 para actualizarlos de nuevo, de modo que se correspondía aproximadamente con un año de trabajo. Desde ese momento, se repitieron las actualizaciones hasta alcanzar un grupo de 50000 muestras y a partir de ahí sólo se realizaron comprobaciones si se produce algún cambio en el procedimiento analítico o se cambia de lotes de fabricación de los IS. Los puntos de corte fueron actualizados en enero de 2005, sobre la base que en esos momentos incluía aproximadamente 87000 pacientes, y ya no fueron modificados hasta el final del presente estudio. En el momento actual, julio de 2007, los puntos de corte en uso se corresponden con los valores de percentiles que aparecen en la Tabla 39.

Los puntos de corte son un punto neurálgico en el funcionamiento del cribado de ECM por MS/MS pues de ellos se deriva en gran medida su eficacia.

En la Tabla 74 se recogen los puntos de corte actuales de nuestro laboratorio junto a otros pertenecientes a publicaciones recientes.

Como se puede observar, aunque existe una concordancia general entre los valores en todos los casos existen algunas diferencias llamativas entre sí.

En términos generales el planteamiento de nuestro laboratorio es conservador en cuanto que sacrificamos en parte la especificidad en la búsqueda de la máxima sensibilidad y esto se refleja en que nuestros puntos de corte son similares o inferiores a los manejados por los otros laboratorios y solo en contados casos, como la C5:1 o la C18:1, sucede lo contrario. Aunque no tenemos constancia de falsos negativos, el hecho de tratarse de un laboratorio relativamente pequeño hace que sólo con un trabajo continuado de varios años se pueda acumular la suficiente experiencia de casos detectados como para alimentar una corrección de estos puntos de corte con los datos de los diagnósticos realizados.

Las diferencias más notables se producen en la C4 y la C8. En ambos casos nuestra experiencia de diagnósticos es importante y en ambos también no se produce un número importante de falsos positivos pese al valor utilizado porque se complementan con otras AC y ratios específicos.

## Discusión

Analito	Puntos de corte						
	Wisconsin	N. Carolina	New England	S. Korea	CDC	Nuestro laboratorio	
	Ref. 60	Ref. 38(Diag)	Ref. 39	Ref.124	Ref.100	99.5%	99.9%
C3	6.92	9,00	8,00	7.2	7.1	4,71	6,03
C4	1.2	5,00	1.9	1.47	1.57	0,75	0,95
C4OH	0.48					0,60	0,89
C5	0.44	2.5	1.2	1.2	0.86	0,96	1,32
C5:1	0.13	0.75	0.08	0.38		0,22	0,35
C5OH	0.5	2.6	0.8	0.38		0,35	0,50
C6DC	0.2		0.12			0,13	0,17
C6	0.3	0.63		0.56	0.59	0,32	0,40
C8	0.5	0.73	0.5	0.52	0.52	0,19	0,26
C10:1	0.4	0.31		0.23		0,22	0,28
C10	0.34	0.46		0.57	0.55	0,33	0,44
C3DC	0.48		0.8			0,13	0,18
C4DC						0,46	0,57
C5DC	0.10	0.38	0.21	0.22	0.35	0,18	0,23
C12		0.9		0.32		0,87	1,26
C14:2	0.25			0.13		0,11	0,15
C14:1	0.6	0.75	0.9	0.21		0,47	0,65
C14	0.8	0.97		1.05	0.79	0,52	0,64
C16	8.7	10.26	12,00	8.47	8.38	5,93	7,14
C18:2	0.9					0,60	0,74
C18:1	2.8	4.08		2.1		3,18	3,77
C18				1.66		1,91	2,29
C16OH	0.12	0.18	0.1	0.08		0,08	0,12
C16-1OH	0.18			0.12		0,12	0,15
C18-1OH	0.1	0.14		0.07		0,09	0,13
C18-OH				0.05		0,07	0,10
C3/C2	0.2	0.15		0.58		0,20	0,25
C4/C2	0.08					0,04	0,05
C5/C2	0.05					0,06	0,10
C3DC/C4OH	0.48					1,00	1,40
C4/C3	0.9			0.92		0,81	1,04
C5/C3	0.5			5.1		0,96	1,50
C8/C10	10,00	3,00				2,25	3,54
C14:1/C12:1		3,00				13,56	24,19
C14:1/C16	0.3					0,18	0,27

Tabla 74. Puntos de corte obtenidos en el presente trabajo y en algunos laboratorios de cribado



## ***Discusión***

En general los valores utilizados en el laboratorio de North Carolina son mucho más elevados y, aunque ellos utilizan también una estrategia de dos niveles de decisión, en alguna AC los valores son inexplicables salvo que se estén midiendo dos cosas diferentes.

Un caso llamativo es asimismo el valor suministrado para C5 por el centro del estado de Wisconsin. Esta es una AC que se ve claramente alterada por agentes externos y en nuestra experiencia solo se alcanzarían valores similares, Tabla 57b, a partir del tercer mes de vida en que el número de casos que reciben los fármacos que la afectan disminuye de forma muy significativa.

En la práctica, para la mayoría de las enfermedades a diagnosticar, se trabaja con perfiles diagnósticos que permiten alcanzar valores predictivos positivos elevados.

Las variaciones en algunas de las AC son críticas porque los ECM pueden presentarse de muy diversas formas y, en algunos casos, como la GA I o la MMA, con valores prácticamente normales de C5DC y C3 respectivamente. Puesto que el disminuir los puntos de corte supone un sacrificio de especificidad y aun así sin alcanzar la seguridad necesaria, la estrategia actual de los laboratorios pasa en unos casos por la incorporación de algunas de las denominadas pruebas de segundo nivel<sup>125</sup> y, en otros, como el nuestro, donde se dispone de muestra de orina en papel, de la realización de pruebas de confirmación por MS/MS haciendo uso de ella.<sup>126</sup>

Como se ha visto en la Tabla 74, las diferencias entre los puntos de corte manejados por los laboratorios pueden ser importantes. En la Figura 57 se presentan los puntos de corte suministrados por los más de 100 laboratorios que participaron en el programa de PT del CDC. Aunque los valores de la media y la mediana son del orden de los obtenidos por nosotros y también de los otros que aparecían en la tabla, si observamos los rangos veremos que algunos laboratorios manejan valores absolutamente diferentes y detrás de los cuales no cabe pensar solamente en problemas derivados de los IS frente a los que se realiza la cuantificación.

Con el fin de avanzar en esta armonización de puntos de corte como uno de sus fines, nació la iniciativa “Region 4 Genetics” que se abordará en el apartado siguiente.

TABLE 1. 2005 Summary of MS/MS Cutoff Values of Domestic and Foreign Laboratories					
<b>Domestic</b>					
Analyte	N	Mean	Median	Mode	Min/Max
Phenylalanine	35	2.4	2.3	2.3	1.8-3.6
Leucine	36	3.7	3.9	2.6	2.6-6.0
Methionine	35	1.3	1.3	1.5	0.7-2.0
Tyrosine	32	7.8	7.2	12.7	1.6-12.7
Valine	27	3.3	3.2	3.2	2.3-4.4
Citrulline	34	1.1	1.1	1.1	0.4-1.8
C3	37	6.97	7.00	9.25	1.20-10.43
C4	37	1.47	1.57	1.80	0.44-2.50
C5	37	0.85	0.86	1.20	0.32-1.20
C5DC	37	0.27	0.30	0.35	0.09-0.50
C6	36	0.52	0.57	0.70	0.16-1.05
C8	41	0.48	0.50	0.50	0.17-1.00
C10	36	0.54	0.53	0.60	0.24-1.21
C14	33	0.82	0.80	1.10	0.17-1.10
C16	34	8.52	9.00	10.00	0.41-11.23
<b>Foreign</b>					
Analyte	N	Mean	Median	Mode	Min/Max
Phenylalanine	78	2.4	2.3	2.5	1.1-4.0
Leucine	69	4.3	4.1	3.9	2.0-7.0
Methionine	68	1.0	0.9	0.9	0.4-2.7
Tyrosine	76	5.7	5.6	6.3	1.4-15.0
Valine	61	3.5	3.5	3.5	1.7-6.9
Citrulline	64	1.1	1.0	0.9	0.3-2.6
C3	72	6.00	6.00	6.00	2.60-10.00
C4	70	1.29	1.28	1.00	0.40-5.00
C5	72	0.82	0.64	0.60	0.18-3.30
C5DC	71	0.28	0.20	0.20	0.09-1.70
C6	71	0.44	0.40	0.21	0.10-2.03
C8	77	0.42	0.42	0.50	0.14-1.05
C10	69	0.47	0.43	0.50	0.14-1.20
C14	70	0.77	0.70	0.50	0.19-1.66
C16	72	7.85	8.00	8.00	2.10-14.00

Figura 57. Resumen de los puntos de corte manejados por los laboratorios participantes en el programa de PT del CDC en 2005.

### ***7. Evaluación de rangos de referencia y puntos de corte a través de la participación en el proyecto “Region-4-Genetics”***

A través de los programas de CC se ha puesto de manifiesto que tras la expansión de los programas de cribado neonatal por MS/MS se hace necesario avanzar en el conocimiento y control de las posibilidades y limitaciones de las pruebas que se realizan.

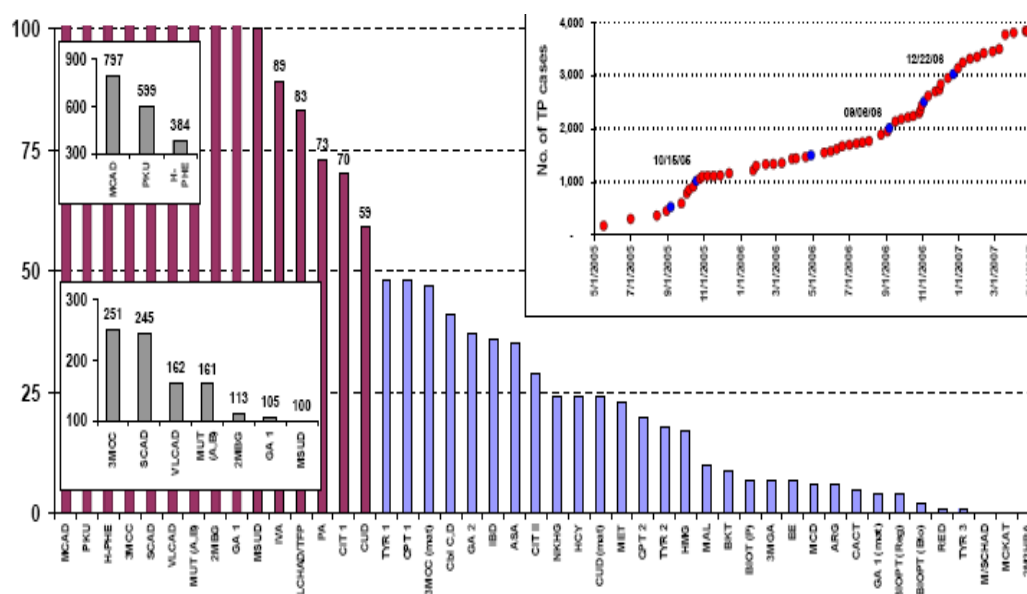
La ausencia de recomendaciones concretas acerca de los criterios a utilizar a la hora de establecer puntos de corte y lo limitado de las comparaciones interlaboratorio ha contribuido a aumentar la confusión de valores utilizados aunque no afecte a su eficacia tal como queda reflejado en el programa de PT del CDC.

La puesta en marcha de propuestas de paneles de enfermedades a detectar, como el del American College of Medical Genetics<sup>127</sup> (ACMG) que implica el diagnóstico diferencial de varias alteraciones en función de la información de los mismos metabolitos, no hace sino incrementar la necesidad de un conocimiento mayor de las características de los análisis por MS/MS.

El proyecto “Region 4 genetics”,<sup>128</sup> coordinado por el Dr. P. Rinaldo (Clínica Mayo, USA) en el que participan más de 40 laboratorios de 15 países y casi otros tantos de Estados Unidos y al que que nos incorporamos nosotros en noviembre de 2006, pretende ayudar a la armonización del trabajo de los laboratorios a partir de su propia información interna.

Los participantes suministran de forma confidencial a la base de datos del proyecto los valores de sus percentiles para todos los metabolitos, los puntos de corte que utilizan y los casos patológicos diagnosticados por ellos con los valores de los metabolitos en el momento de su detección con la única limitación de que deben tener menos de 7 días de vida y ser los de la primera muestra recibida por el laboratorio.

De esta forma, se favorece un intercambio de información que permita a los laboratorios contrastar sus valores y tomar decisiones cara a su mejora y se acumula la experiencia de muchos laboratorios en el diagnóstico de enfermedades que son raras o muy raras. La mayoría de los participantes necesitarían muchos años para poder tener un número suficiente de casos de algunas de las enfermedades para en base a ellos aumentar la calidad del trabajo que realizan.



**Figura 58. Casos acumulados de las diferentes patologías hasta abril de 2007 (Incluye AA)**

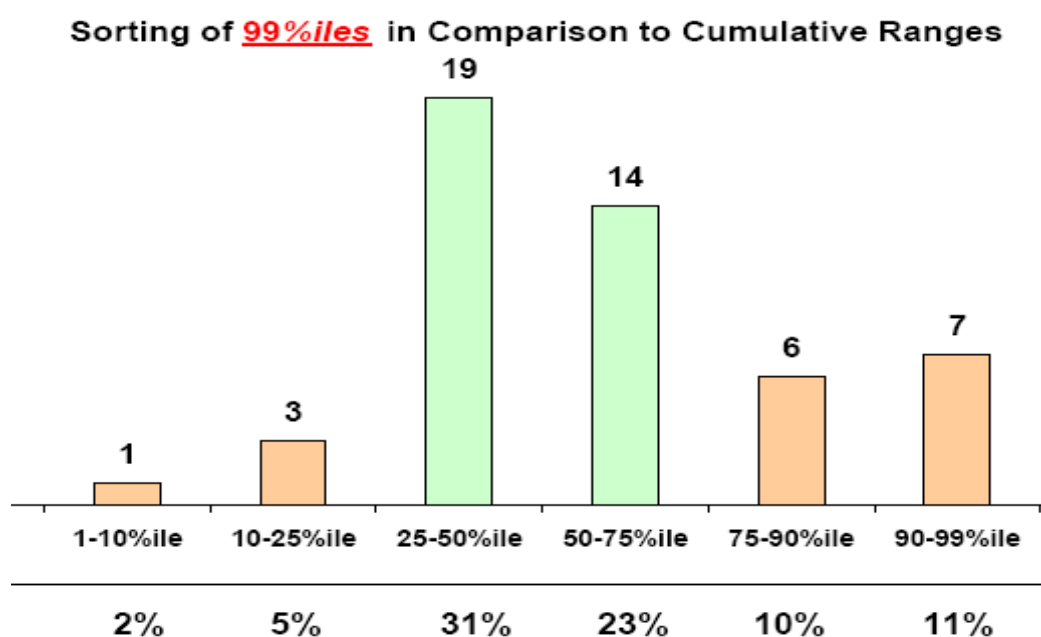
En la Figura 58, aparece el total de casos verdaderos positivos (TP) acumulados hasta abril de 2007, así como la progresión seguida por el número de casos registrados. El objetivo marcado por los organizadores es alcanzar al menos 50 casos de cada una de las patologías, por considerar que, hasta ese número, no son representativos los valores que presentaban los pacientes para los metabolitos diagnósticos en el momento de su detección como para poder agruparlos y recomendar puntos de cortes basados en la experiencia acumulada. Como puede verse son cerca de 30 las enfermedades que todavía no alcanzaban ese número pese al elevado número de casos incorporados. En los 6 meses pasados desde nuestra incorporación han sido incluidos 1219 casos nuevos y en este número están incluidos los 38 aportados por nosotros.

En lo referente a percentiles de la población normal, se solicita de los participantes los percentiles 1, 50 y 99 de cada metabolito con el fin de tener información de la distribución de sus valores. Cada participante puede comprobar gráficamente la ubicación de sus valores frente al conjunto de laboratorios, con el fin de sacar conclusiones respecto a la cuantificación realizada, y también comprobar en una gráfica porcentual resumen (que aparece recogida en la Figura 59) las coincidencias del conjunto de valores manejados para todos los metabolitos frente al global de los laboratorios y que, aunque varía según de cual

## Discusión

se trate, se corresponde aproximadamente con el 50% de los inscritos. El grado de coincidencia de nuestros valores con el conjunto es muy elevado, el 55% de nuestros valores está en el rango intercuartílico y si tomásemos los valores del percentil 50 dicha concordancia sería similar, del 47%.

El % residual, que no aparece en la figura, se corresponde con los valores extremos y se trata en todos los casos de ratios de metabolitos.



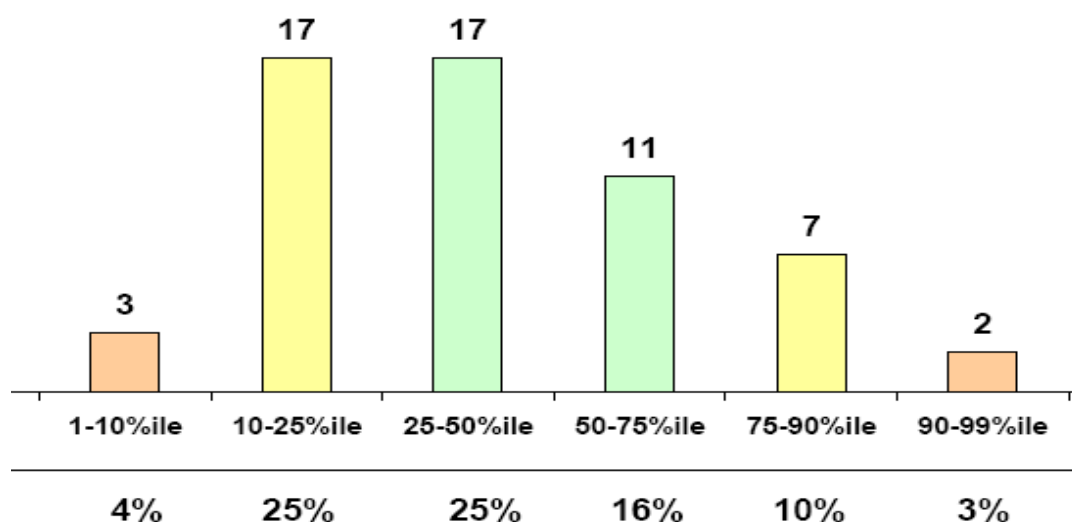
**Figura 59. Distribución porcentual de nuestro p 99 para cada metabolito frente al conjunto de los laboratorios participantes (Incluye AA).**

De igual forma, cada laboratorio participante suministra los puntos de corte que utiliza, sin entrar en como los calcula, que son agrupados en percentiles de forma que pueden ser contrastados de forma individual para comprobar las posibles divergencias y también de forma resumida, Figura 60, con el fin de valorar en conjunto la posición y estrategia de cada laboratorio. Puesto que los puntos de corte responden a los planteamientos de sensibilidad y especificidad que se fijan los participantes, y también a estrategias diagnósticas según dispongan de mas o menos pruebas de segundo nivel, aquí pueden aparecer divergencias para determinados metabolitos que no tienen por qué responder a errores, IS o forma de cálculo y es de gran utilidad la información recibida. En nuestro

## Discusión

caso se enviaron los valores correspondientes al punto de corte de “alerta”, percentil 99.5, y tal como era de esperar aparece un grupo importante de ellos en la franja del percentil 10 al 25 globales. Puesto que disponemos de otro corte superior, de “alarma”, la conclusión inicial es que la estrategia establecida por nosotros es adecuada y es de esperar que se obtenga con ella una muy alta sensibilidad y una alta especificidad. Puesto que el margen de mejora, en nuestro caso está en la especificidad, disminuyendo el número de repeticiones asociadas a unos cuantos metabolitos que son diagnósticos para enfermedades de las que carecemos de casuística, nos encontramos en la actualidad a la espera de concluir las mejoras posibles que se deduzcan del presente trabajo para completarlo y complementarlo con la información recibida del proyecto.

### Sorting of Cutoff Values in Comparison to Cumulative %iles



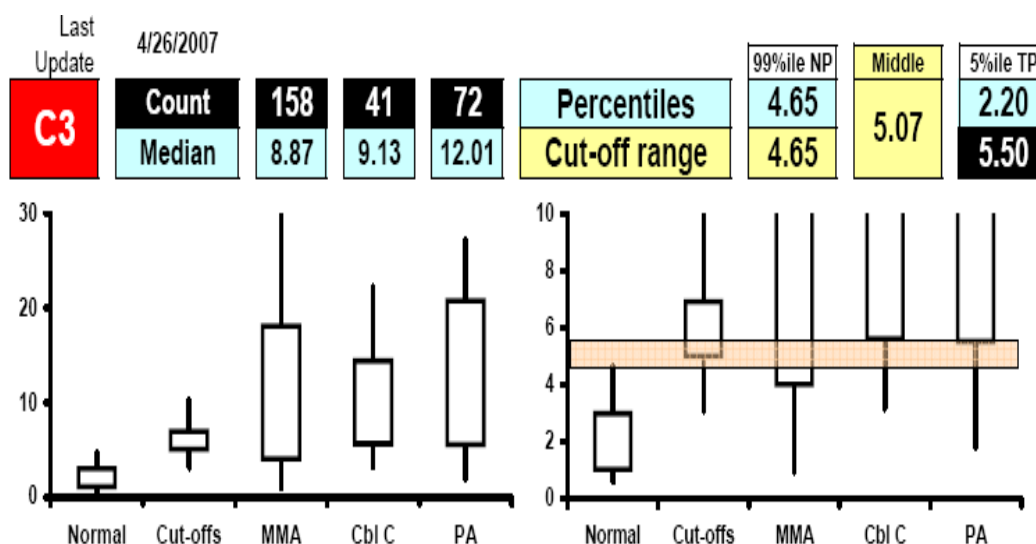
**Figura 60. Distribución porcentual de nuestros puntos de corte ( $p$  99.5) frente al conjunto de los suministrados por los laboratorios participantes (Incluye AA)**

Una contribución a la mejora muy importante se deduce de la acumulación de casos suministrados por todos los participantes.

En la Figura 61 puede verse, con la C3 como ejemplo, que aparecen (parte izquierda) los valores de referencia de todas las poblaciones, a su lado los puntos de corte y a continuación los valores al diagnóstico acumulados para las tres posibles patologías involucradas: MMA, déficit de cobalamina B y PA con su correspondiente balance de

## Discusión

casos y valores de C3 encima. Se produce un solapamiento de los intervalos que queda reflejado de forma más clara en la parte de la derecha cuando tratamos de marcar la zona donde teóricamente se debe encontrar el punto de corte, la franja comprendida entre el percentil 99 de los normales y el 5 de los patológicos.



**Figura 61. Gráfica de todos los valores de C3 (normales, punto de corte usados y patológicos) para el conjunto de participantes y zona resultante para el punto de corte recomendado**

La Figura 61 es, por tanto, un claro ejemplo de las dificultades con las que se encuentran los laboratorios a la hora de establecer el punto de corte de C3. La franja recomendada iría de 4.65 a 5.50 pero, aún en el caso de un planteamiento conservador, seleccionando el valor más bajo, nos encontraremos ante una posibilidad importante de falsos negativos de MMA y al precio de un elevado número de falsos positivos. Esta es la causa de que no se pueda asegurar el diagnóstico de la MMA en base solo a la C3 y se deba recurrir o bien a pruebas complementarias de segundo nivel, además de la C4DC, o como es el caso de nuestro laboratorio al análisis de la orina de los sujetos sospechosos. Nuestro punto de corte para la C3 es en la actualidad 4.72, responde por tanto bien a una estrategia conservadora pero con pruebas a dos niveles.

Una primera recomendación que ha surgido del proyecto “Region 4 Genetics” son unos parámetros mínimos de calidad que se recomienda cumplir<sup>129</sup> por parte de los laboratorios: como indicativa de una adecuada calidad analítica y postanalítica: una tasa de detecciones

de 1:3000 o superior, un valor predictivo positivo >20% y una tasa de falsos positivos <0.3%.

### ***8. Sensibilidad y Especificidad del Método: Valores predictivos en base a los resultados obtenidos***

Los procedimientos analíticos utilizados en el diagnóstico precoz de ECM son frecuentemente evaluados en función del número de resultados falsamente positivos o negativos a que conducen.

Los falsos negativos son difíciles de cuantificar por cuanto pueden pasar meses e incluso años hasta que aparecen los síntomas que conducen a la conclusión de que se ha producido. Por ello, se suele considerar el valor predictivo positivo (VPP) como el mejor indicador<sup>130</sup> de la eficacia de un cribado.

El criterio para considerar un caso como falso positivo, suele ser que se produzca un resultado sugerente de diagnóstico y este no se confirme con una nueva muestra.<sup>38,129</sup>

Cuando se trabaja con una estrategia de corte a dos niveles, que tras dos resultados “borderline” no haya confirmación de presencia de patología.

El importante aumento que se produce de falsos positivos con la introducción del cribado metabólico por MS/MS, ha sido motivo de preocupación y análisis<sup>129,131</sup> y también de la adopción de estrategias concretas de segundas pruebas para disminuir su número.

De entre las patologías detectadas, se han seleccionado aquellas de las que disponemos de más de un caso y para cada una de ellas se han agrupado todos con sus valores de los marcadores más importantes. De esta forma, en las Tabla 63 a Tabla 68 aparecen resumidos los casos de MCAD, GA I, LCHAD, MMA, MCC y SCAD diagnosticados durante el período del presente trabajo, julio de 2000 a diciembre de 2005.

Para la MCAD, sin duda la patología más frecuente de entre los defectos de la FAO, se han seleccionado C8, C6, C10:1 y C8/C10 (Tabla 63). El principal marcador, C8, presenta elevaciones muy importantes que permitirían aumentar de forma importante el punto de corte, también en parte el cociente C8/C10 pero no así los otros dos. Para la C6, ya aparecen 916 casos por encima del p99, y para la C10:1, que no se ha incluido, aparecen más de 800 también por encima del p99, con lo que su aportación fue en nuestra



## ***Discusión***

experiencia nula. En la Tabla 69, puede verse cómo de forma aislada para la C8 se tiene ya un VPP alto, 35%, utilizando el p99.99 pero llega al 100% al combinarlo con el cociente C8/C10, pese a que éste de forma aislada sólo tenía un VPP del 5.88%. Se trata, sin duda, de resultados muy satisfactorios por la robustez que refleja para la detección de la MCAD la MS/MS.

Para la GA I, una de las metodologías más conflictivas para el cribado por existir un único marcador, la C5DC, que puede aparecer muy poco elevada o incluso a niveles normales si se trata de individuos no excretores, se recoge la C5DC y los cocientes sobre C16 y C2 (Tabla 64). El punto de corte para la C5DC no puede elevarse mucho sin riesgo de tener falsos negativos, por lo que el p99.9 seleccionado sólo aporta un VPP del 2.38%. De entre los dos cocientes, el C5DC/C16 se mostró muy poco específico debido a las frecuentes variaciones de C16 y no fue considerado. Sin embargo, el C5DC/C2 resultó ser incluso mejor marcador que la C5DC aislada, con sólo 41 falsos positivos para el p99.9. Como puede verse en el resumen de resultados de la Tabla 70, la combinación de ambos marcadores eleva el VPP para la GA I hasta un pobre 8.33% que refleja lo que era previsible por los datos de la enfermedad y que justifica la decisión adoptada por nuestro laboratorio de realizar la determinación de C5DC en orina como prueba de segundo nivel.

Para la LCHAD los marcadores son todas las AC de cadena larga y muy larga OH derivadas, pero con especial relevancia la C16OH, C18-1OH y la C18-2OH que aparecen en la Tabla 65. Se trata en todos los casos de AC que en circunstancias normales aparecen en la sangre a muy baja concentración y por ello su elevación va a ser altamente específica, con VPP de forma individual superiores al 20%. Sin embargo, y en contrapartida, como puede apreciarse en la Tabla 71, el uso de más de una de ellas no produce un aumento importante del VPP, del 27.27% hasta el 37.5, por tratarse de perfiles altamente característicos y que presentan un aumento generalizado de todas ellas.

La MMA engloba en realidad un grupo de varias patologías diferentes que son de difícil detección en el período neonatal con un grado elevado de eficacia. Los marcadores utilizados son la C3, C4DC y el ratio C3/C2, que aparecen en la Tabla 66, aunque es bien conocido que la C4DC no se eleva durante el período neonatal. Además, como ha podido observarse en la Figura 61 con los datos recogidos de los casos del proyecto “region4genetics”, las elevaciones de la C3 pueden ser moderadas y pasar inadvertidas.

## ***Discusión***

Todo lo expuesto hace que sean enfermedades que los programas de cribado no garantizan su detección. En nuestra experiencia de este período se han detectado 6 casos pero todos ellos de los denominados “formas suaves” y que se caracterizan por una no muy elevada excreción de ácido metilmalónico en orina. De esos casos, dos fueron detectados a través de pequeñas elevaciones de C3 en el período neonatal, otros dos a través del ensayo de tinción con ortodianisidina realizado de forma rutinaria a todas muestras de orina, también en el período neonatal y las dos restantes a través de elevaciones moderadas de la C4DC. En estos últimos dos casos se trataba de niños que ya tenían varios meses de edad cuando fueron sometidos a las pruebas de cribado metabólico por MS/MS.

La MCC es una enfermedad cuya inclusión en los programas de cribado ha sido también objeto de controversia en algunos países<sup>132</sup> y que cursa con la elevación moderada de un único marcador, la C5OH (Tabla 67). También se usa el ratio C5OH/C16, pero, en nuestra experiencia, en el único caso detectado en el período neonatal, este cociente se encontraba por debajo del p99. En los dos casos detectados por nosotros, la C5OH se encontraba elevada por encima del p99.99 de sus respectivos grupos de edad mostrando por tanto una alta sensibilidad para su detección. Sin embargo se trata de un marcador que aparece elevado en varias patologías diferentes, hasta cinco, y que no es por tanto muy específico pero como consecuencia muchos casos de MCC son diagnosticados, aún sin ser incluida su detección en el panel principal, como fruto del diagnóstico diferencial entre estas patologías.

La SCAD es un defecto de la FAO relativamente frecuente también y que cursa con una elevación de la C4 y como consecuencia de los ratios de ella con otras carnitinas de cadena corta o media, Tabla 68. Si clínica, al igual que muchos otros ECM, puede ser muy variada y esto unido a lo inespecífico del marcador utilizado, por la frecuencia con que se producen elevaciones no patológicas de la C4, ha hecho que no sea igualmente incluida en el panel principal de cribado. Existe sin embargo otra alteración, la IBD, que cursa con elevación de C4 y en la GA II se produce también aunque de manera no específica y de nuevo su inclusión está forzada por el diagnóstico diferencial con estas entidades. En nuestro caso se han diagnosticado cuatro casos, dos en el período neonatal y dos en los primeros meses de vida. En todos ellos se apreció una clara elevación de C4, por encima del p99.9, aunque no así de los ratios asociados pues solamente el C4/C2 se mostró suficientemente sensible. Sin

## ***Discusión***

embargo los VPP obtenidos, Tabla 72, son muy discretos 4.08% para la C4 y 1.46% para su ratio concordando por tanto con las publicaciones recientes existente.<sup>38,125</sup>

Aunque el análisis realizado solo ha podido aplicarse a unas pocas de las patologías detectables por MS/MS, por tratarse de ECM de muy baja incidencia y para las que un laboratorio medio como el nuestro precisa de un período prolongado de estudio para tener datos representativos, nuestros datos confirman una alta eficacia, con valores del VPP por encima del 20% tal como se ha recomendado, para la MCAD la GA I y la LCHAD.

Unido a lo anterior, los datos aportados por nuestra participación en el proyecto “region4genetics” hacen prever que se puedan tener también altos VPP para muchas otras patologías y parece muy recomendable llegar a puntos de corte de consenso entre los nuestros y los que allí se recogen con el fin de garantizarlo.

Existen sin embargo otras recomendaciones como que el número de repeticiones globales sea inferior al 0.3% o que el número de reanálisis no pase del 5% y que solo un 12.5% de estos sean motivo de una repetición, tras su reevaluación teniendo presentes los datos demográficos, que parecen mas lejos de alcanzar. Como causa de ello están en buena medida algunos datos como los analizados en este apartado, la MMA o la SCAD, que unidos a otros pocos (las elevaciones de C3 o C5) son los causantes de la mayor parte de las repeticiones actuales que se producen en nuestro laboratorio y con ello de algunas bajas especificidades.

Solo con la introducción de pruebas de segundo nivel<sup>125</sup> para algunas patologías pueden alcanzarse VPP globales del orden del 33% o incluso superiores y ese es el reto actual con el que nos encontramos.

## ***9. Enfermedades detectables y Diagnósticos realizados durante el período de trabajo 2000-2005***

Dos de los tres grandes grupos de alteraciones detectables por MS/MS dentro de los programas de cribado neonatal son abordadas a través de la determinación de AC y carnitina libre: Las alteraciones de la FAO mitocondrial y las del metabolismo de los ácidos orgánicos.

### **9.1. Defectos de la oxidación de los ácidos grasos (FAO)**

Durante los periodos de ayuno y tras disminuir las reservas de glucógeno, los ácidos grasos de cadena larga (C16-C20) son movilizados desde los puntos periféricos de almacenamiento en el tejido adiposo hasta las mitocondrias hepáticas donde tiene lugar su  $\beta$ -oxidación para obtener energía y con la consiguiente formación de cuerpos cetónicos<sup>133</sup>. La ruta metabólica es compleja, Figura 62, y conlleva varias etapas: Incorporación de carnitina a través de la membrana celular mediante un Transportador específico, activación a ésteres de acil-CoA, trans-esterificación a AC (CPT I), translocación de las AC a través de la membrana mitocondrial (CéC) y transesterificación a ésteres de acil-CoA (CPT II). Una vez en la mitocondria, estos esteres entran en la espiral de la  $\beta$ -oxidación que conlleva deshidrogenación a enoil-CoA, hidratación a 3-OH-acil-CoA, deshidrogenación a 3-ceto-acil-CoA y corte por la tiolasa para formar un nuevo acil-CoA con dos carbonos menos que entra de nuevo en la espiral. La  $\beta$ -oxidación involucra a varios enzimas: VLCAD, LCHAD/MTP, MCAD, SCAD, MCHAD, SCHAD responsables de diferentes pasos y cuyo déficit conlleva la aparición de los FAO, Tabla 75, y a muchos otros con funciones mas específicas así como a diferentes cofactores.

Entre las principales manifestaciones clínicas de los FAO estan cardiomiopatía, miopatía esquelética, hepatomegalia e hipoglucemia que pueden combinarse de diferentes formas<sup>36,134</sup>. Es característico de los FAO la existencia de diferentes formas de presentación, una neonatal aguda y que llega a ser letal y otras dos formas medias menos agresivas una de la primera infancia y otra que puede aparecer en la adolescencia o incluso ya en los adultos. El tratamiento de estos pacientes está bien documentado<sup>135,136</sup> y conlleva la corrección de las crisis metabólicas agudas, evitar periodos de ayuno prolongados, una dieta baja en grasas y la administración de carnitina y riboflavina.

En la Tabla 75 aparecen recogidos los principales defectos de la FAO junto a las AC usadas como marcadores para su diagnóstico y los valores de los puntos de corte (p99.5) utilizados para su cribado y que han sido obtenidos en el presente trabajo. Asimismo se incluye una propuesta de puntos de corte optimizada que incluye aquellos para los que hemos tenido los VPP más altos con la información de los casos detectados y tambien otros tomados de nuestra participación en el proyecto “region-4-genetics”.

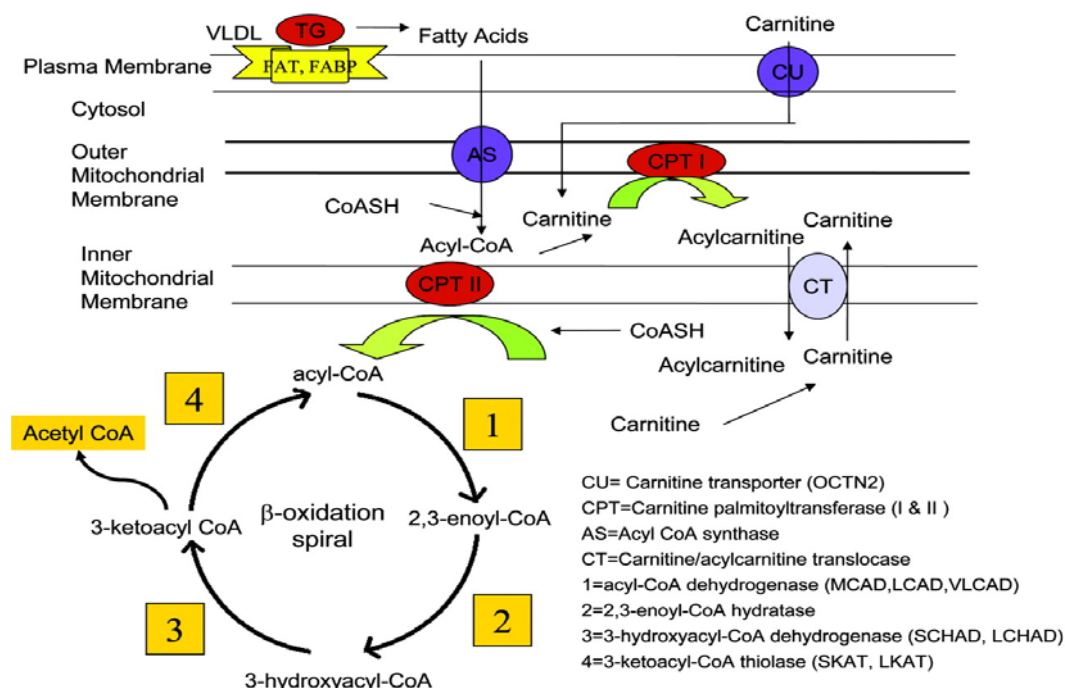


Figura 62. Defectos  $\beta$ -oxidación ácidos grasos. Vía oxidación mitocondrial

Los valores de los puntos de corte propuestos, de acuerdo con el criterio referido en el párrafo anterior, permiten ver que existen pocas discrepancias con respecto a los empleados por nosotros habitualmente en la detección de ECM por MS/MS y que son fruto de la experiencia acumulada de trabajo de mas de 5 años. Tan solo es de reseñar que no nos ha sido posible proponer un punto de corte optimizado para una de las AC mas importantes, la C5, porque los valores manejados por nosotros son sensiblemente mas altos y la única explicación estaría en el amplio uso de antibióticos en el periodo neonatal que afectan a dicha AC y falsean el valor de los percentiles obtenidos por nosotros.

## Discusión

Defectos FAO	AC / p99.5	AC / Punto corte propuesto
Def. deshidrogenasa acil-CoA de cadena muy larga. (VLCAD)	C14:1 > 0.47 C14 > 0.52 C14:2 > 0.11 C14:1/C16 > 0.18	C14:1 > 0.51 C14 > 0.60 C14:2 > 0.14 C14:1/C16 > 0.18
Def. deshidrogenasa acil-CoA de cadena larga. (LCHAD)	C16OH > 0.08 C18:1OH > 0.12 C16:1OH > 0.08	C16OH > 0.20* C18:1OH > 0.24* C16:1OH > 0.13*
Def. deshidrogenasa acil-CoA de cadena media.(MCAD)	C8 > 0.19 C6 > 0.32 C10:1 > 0.22 C8/C10 > 2.25	C8 > 0.52* C6 > 0.21 C10:1 > 0.13 C8/C10 > 3.54*
Def. deshidrogenasa acil-CoA de cadena corta. (SCAD)	C4 > 0.75 C4/C2 > 0.04	C4 > 1.07* C4/C2 > 0.05*
Déficit Múltiple de deshidrogenasa Acil-CoA (MADD)	C10 > 0.33 C4 > 0.75 C8 > 0.19 C5 > 0.96 C5/C3 > 0.96	C10 > 0.28 C4 > 1.07* C8 > 0.52*
Def. carnitina palmitoil transferasa (CPT I)	C0 > 54.5 C0/C16+C18 > 25.1	C0 > 50 C0/C16+C18 > 27
Déficit de la carnitina palmitoil transferasa (CPT II)	C18:2 > 0.60 C18:1 > 3.18 C16 > 5.93	C18:1 > 2.46 C16 > 6.73
Def. en el transportador de carnitina (CUD)	C0 < 6.7	
Defecto de la Carnitina/Acilocarnitina Translocasa (CAT)	C16 > 5.93 C18:1 > 3.18 C18 > 1.91	C16 > 6.73 C18:1 > 2.46 C18 > 1.55
Def. de la 2,4dienoil CoA reductasa (DRED)	C10:2 > 0.10	
Def. hidroxiacil CoA deshidrogenasas de cadena corta y media (M/SCHAD)	C4OH > 0.60 C6OH > 0.11	
Def. 3-cetoacil-CoA tiolasa de cadena media (MCKT)	C6DC > 0.13 C3DC/C4OH > 1.00	C6DC > 0.11

\* Valores obtenidos por nosotros

**Tabla 75. Defectos de la FAO detectables mediante la determinación de AC en sangre en papel**

### 9.2. Defectos del metabolismo de los ácidos orgánicos (OA)

Las orgánico acidemias o orgánico acidurias son un grupo heterogéneo de enfermedades metabólicas hereditarias caracterizado por la excreción de no-amino ácidos orgánicos en orina y usualmente causados por un defecto en el catabolismo de los aminoácidos.

La mayoría de las OA son debidas a problemas con los enzimas involucrados en el catabolismo de los aminoácidos ramificados (PA, MMA, MCC, HMG, IVA, BKT) y tambien de la lisina (GA I).

## ***Discusión***

Aunque los niños afectados son aparentemente normales al nacimiento, comienzan con síntomas de enfermedades sistémicas a los pocos días. Pueden presentar vómitos, deshidratación, clínica que se confunde con una sepsis, letargia, hipoglucemia, coma o incluso fallecer en pocos días. La corrección de las crisis metabólicas es de gran importancia<sup>137,138</sup> y los pacientes suelen ser mantenidos con una dieta baja en proteínas y se les administran cofactores en los casos necesarios.

El diagnóstico de las OA mediante su análisis por GC/MS, realizado clásicamente, sigue siendo el paso de confirmación tras un análisis de AC por MS/MS aunque la confirmación definitiva se realiza mediante determinación de la actividad enzimática y análisis moleculares. El diagnóstico precoz mediante programas de cribado, unido a la prevención de las crisis, ha mejorado de forma importante el pronóstico de los pacientes con OA y ha potenciado el diagnóstico prenatal mediante técnicas bioquímicas y moleculares.

En la Tabla 76 se presentan las principales OA junto a las AC usadas como marcadores para su diagnóstico y los valores de los puntos de corte (p99.5) utilizados para su cribado y que han sido obtenidos en el presente trabajo. Asimismo se incluye una propuesta de puntos de corte optimizada que incluye aquellos para los que hemos tenido los VPP más altos con la información de los casos detectados y también otros tomados de nuestra participación en el proyecto “region-4-genetics”.

De los valores propuestos como puntos de corte que aparecen en la Tabla 76 tan solo añadir al ya comentado caso de la C5 el valor sensiblemente más alto propuesto para la C3DC, que no tiene trascendencia alguna por ser marcador de la MA que es una patología muy rara, y algo más elevado para la C5OH.

## Discusión

Acidurias orgánicas	AC / p99.5	AC / Punto corte propuesto
Déficit de Isovaleril CoA deshidrogenasa (IVA) Def. 2-metilbutiril CoA deshidrog. (2MBCD)	C5 > 0.96 C5/C3 > 0.96 C5/C2 > 0.06	
Acidemia propiónica (PA)	C3 > 4.71 C3/C2 > 0.20	C3 > 5.07 C3/C2 > 0.18
Déficit múltiple CoA carboxilasa (MCD)	C3 > 4.71 C5OH > 0.35	C3 > 5.07 C5OH > 0.52
Acidemia glutárica tipo I (GA I)	C5DC > 0.18 C5DC/C2 > 0.017	C5DC > 0.23* C5DC/C2 > 0.017*
Acidemia metilmalónica (MMA) (Por def. de Mutasa, Clb A y B, Clb C y D)	C3 > 4.71 C3/C2 > 0.2	C3 > 5.07 C3/C2 > 0.18
Def. de liasa de 3-OH-metilglutaril CoA (HMG)	C5OH > 0.35 C6DC > 0.13	C5OH > 0.52 C6DC > 0.11
Def. de carboxilasa 3-metilcrotonilCoA (MCC)	C5OH > 0.35	C5OH > 0.52
Def. isobutiril CoA deshidrogenasa (IBD)	C4 > 0.75	C4 > 1.07*
Def. acetoacetil CoA tiolasa mitocondrial ( $\beta$ -KT) 2-metil-3hidroxibutiril CoA deshidrog. (MHBD)	C5:1 > 0.22 C5OH > 0.35	C5:1 > 0.18 C5OH > 0.52
Déficit de 3-metilglutaconil CoA hidrastasa (3MGA)	C6DC > 0.13	C6DC > 0.11
Def. Malonil CoA descarboxilasa (MA)	C3DC > 0.13	C3DC > 0.29

\* Valores obtenidos por nosotros

**Tabla 76. Defectos de los OA detectables mediante la determinación de AC en sangre en papel**

### 9.3. Diagnósticos realizados durante el período Julio 2000 a Diciembre de 2005.

El uso de perfiles metabólicos de AC ha supuesto un gran avance en la detección de las enfermedades incluidas en ambos grupos, FAO y OA. La MS/MS es un potente instrumento para conocer la situación metabólica de un recién nacido y detectar estos ECM, posibles efectos de otras enfermedades sobre las AC o estudiar el efecto de determinados medicamentos sobre el metabolismo intermediario y existen varios trabajos de revisión recientes que vienen a resumir dichos avances.<sup>76.133.139</sup>

Fruto del análisis de las más de 112000 muestras, mayoritariamente de recién nacidos, analizadas, ha sido el diagnóstico de un importante número de casos defectos de la FAO y OA y en la Tabla 62 aparecen recogidos todos los casos considerados como de cribado metabólico. Existe un segundo grupo de casos que han sido detectados o estudiados durante este período en muestras provenientes de estudios diagnósticos de sospecha de pacientes de nuestra área o remitidos desde las diferentes unidades metabólicas de



## ***Discusión***

hospitales de toda España para las cuales nuestra unidad se ha convertido en laboratorio de referencia en la determinación de AC.

En la Figura 63 se presenta el espectro de AC de una muestra normal. Los picos principales se corresponden con la C0 m/z 218, C2 260, C16 456, C18:1 482 y los IS de todas las AC usados.

Se han estudiado 9 casos de MCAD. En la Figura 64 aparece un espectro característico de esta enfermedad donde destaca mucho la C8 a m/z 344 y en menor medida la C6 a 316 y la C10:1 a 370.

Se han estudiado 4 casos de VLCAD. En la Figura 65 aparece un espectro característico de esta enfermedad donde destaca el pico de la C14:1 a m/z 426, prácticamente unido a los de C14 y C14:2, anterior y posterior respectivamente.

Se han estudiado 5 casos de LCHAD. En la Figura 66 aparece el espectro característico de esta enfermedad donde destacan los picos de la C16:OH a m/z 472 y la C18:1OH a 498 respectivamente.

Se han estudiado 5 casos de SCAD. En la Figura 67 aparece un espectro característico de esta enfermedad donde destaca la C4 a m/z 288.

Se ha estudiado un caso de CPT II. En la Figura 68 aparece un espectro de una muestra de un paciente de esta enfermedad en el que se puede ver que cuando se trata de picos minoritarios como la C18:2 o la C16 es difícil apreciar elevaciones. Es importante resaltar además, este es un claro ejemplo, que cuando el paciente no está en crisis las elevaciones de las AC no son muy importantes y el diagnóstico de la CPT II puede resultar difícil.

Se ha estudiado un caso de deficiencia primaria de carnitina, ó del transportador. En la Figura 69 aparece un espectro del paciente estudiado donde puede apreciarse la disminución de la carnitina libre a m/z 218.

Se han estudiado 3 pacientes de MADD. En la Figura 70 aparece un espectro característico de esta enfermedad donde aparecen elevadas varias de las AC de cadena corta y media.

Se han estudiado 4 pacientes con PA. En la Figura 71 puede apreciarse un importante aumento de la C3, marcador de esta enfermedad, a m/z 274.

Se han estudiado 7 pacientes de GA I. En la Figura 72 aparece un espectro de un paciente de esta enfermedad. En este caso nos encontramos de nuevo con que la C5DC, AC

## Discusión

específica únicamente de ella, es un pico pequeño y de difícil evaluación que esta acorde con las conocidas dificultades para su diagnóstico.

Se han estudiado 2 pacientes con IVA. En la Figura 73 aparece el espectro de un paciente de esta enfermedad donde puede apreciarse la muy clara elevación de C5 que se produce a  $m/z$  302.

Se han estudiado 8 pacientes con MMA. En la Figura 74 aparece el espectro de un paciente de esta enfermedad donde la C3 se ve claramente elevada a  $m/z$  274 aunque mucho menos que la que se observaba para la PA en la Figura 71. La C4DC, a  $m/z$  374, suele pasar inadvertida aunque en este caso está ligeramente elevada.

Se han estudiado 3 casos de MCC. En la Figura 75 aparece el espectro de un paciente de esta enfermedad donde se aprecia una importante elevación de la C5OH a  $m/z$  318.

Se ha estudiado un único paciente de HMG, alteración extremadamente rara. En la Figura 76 aparece el espectro de una muestra de este paciente donde se aprecia una discreta elevación de la C5OH a  $m/z$  318 y también de la C6DC a 402.

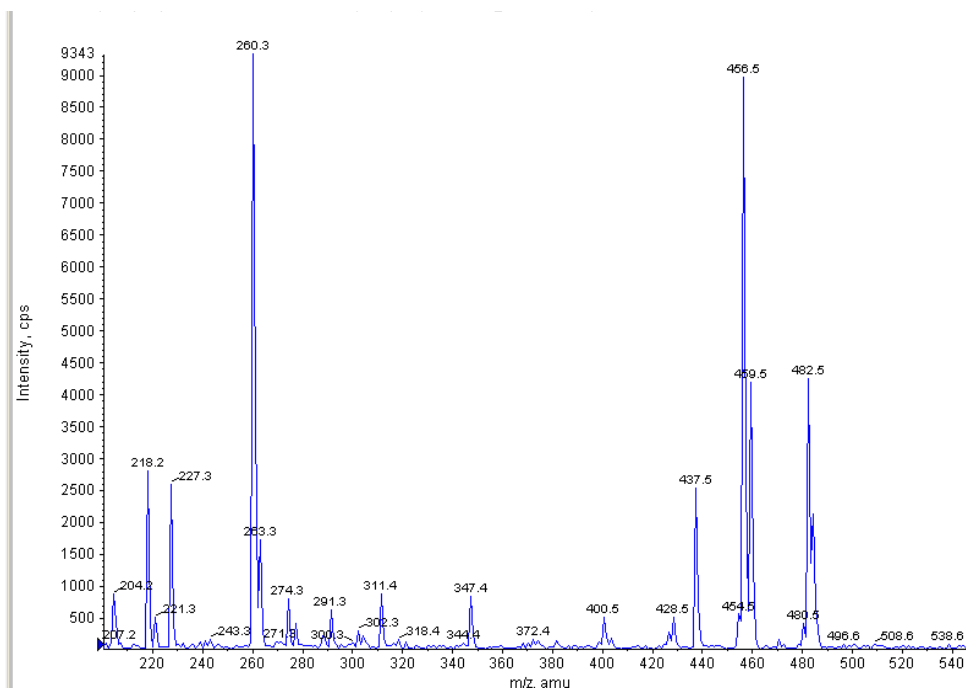
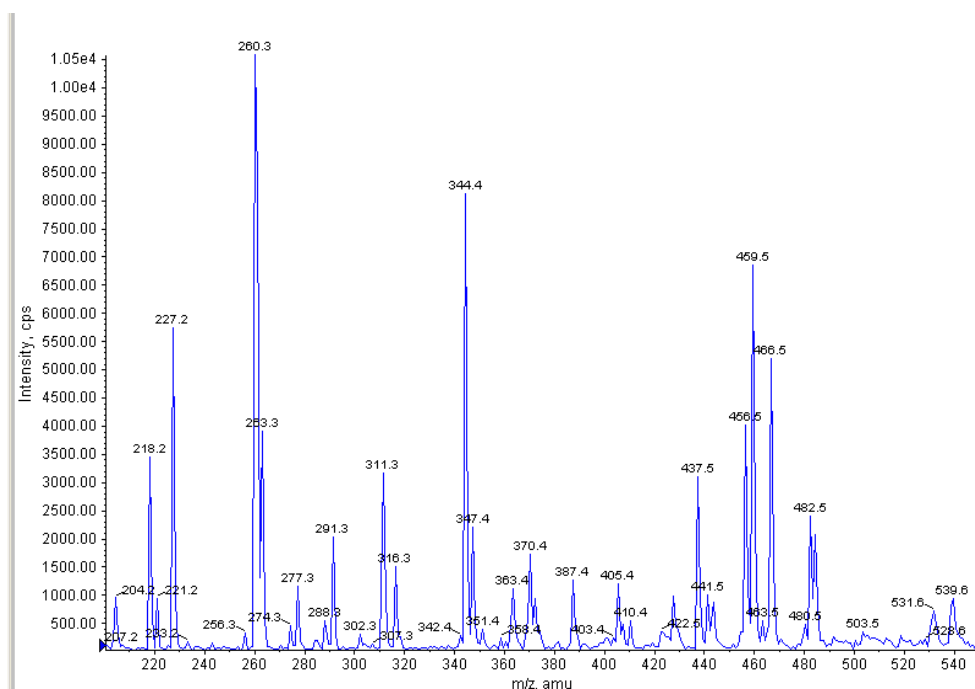
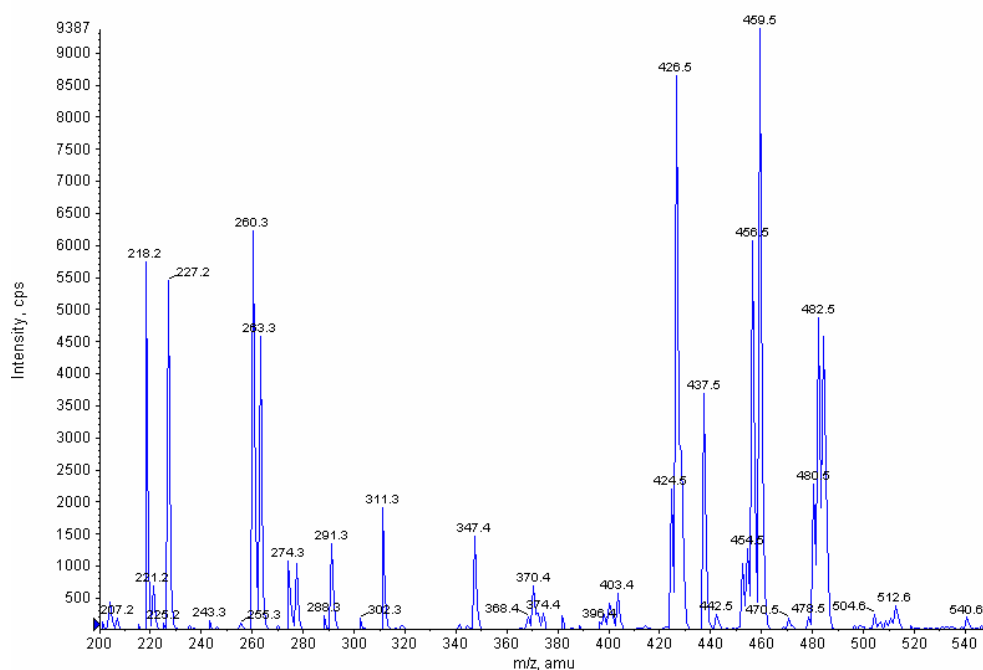


Figura 63. Espectro MS/MS de AC obtenido de una muestra de sangre normal

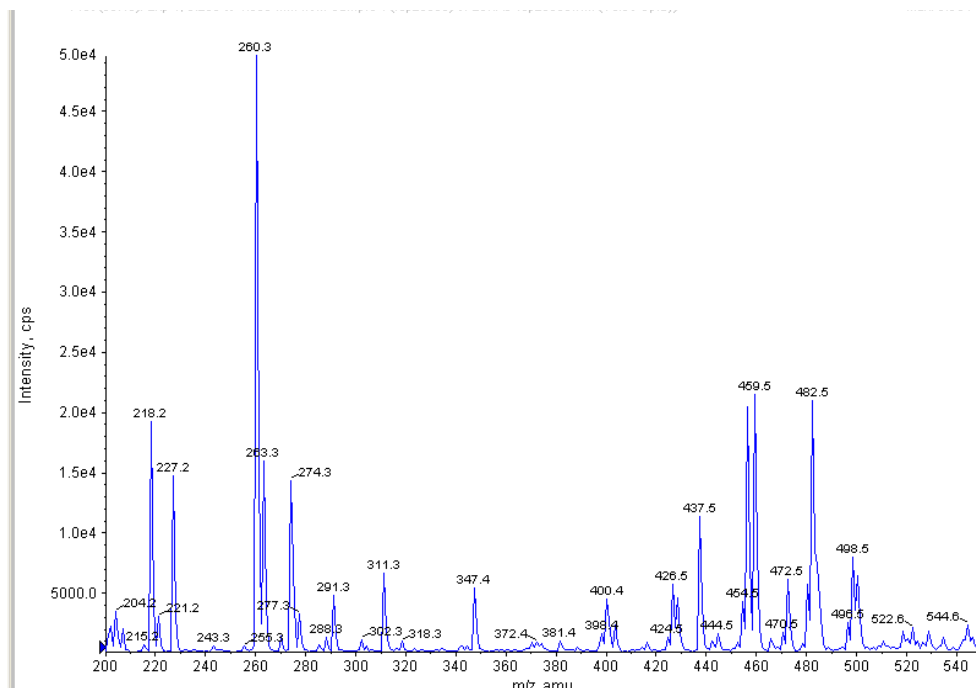


**Figura 64. Espectro MS/MS de AC de una muestra de sangre de un paciente con MCAD**

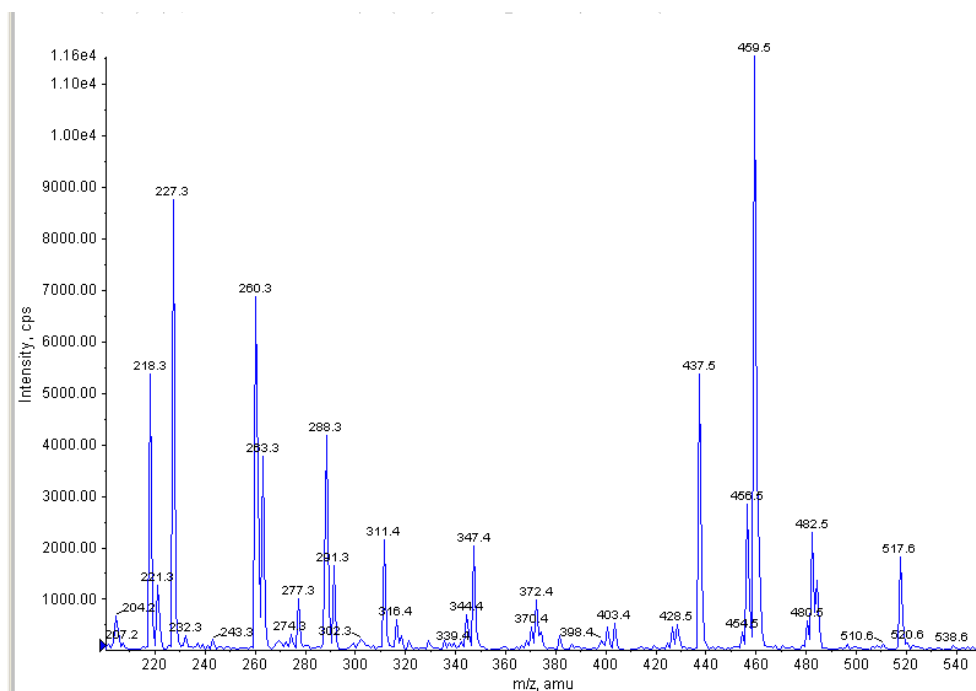


**Figura 65. Espectro MS/MS de AC de una muestra de sangre de un paciente con VLCAD**

## Discusión

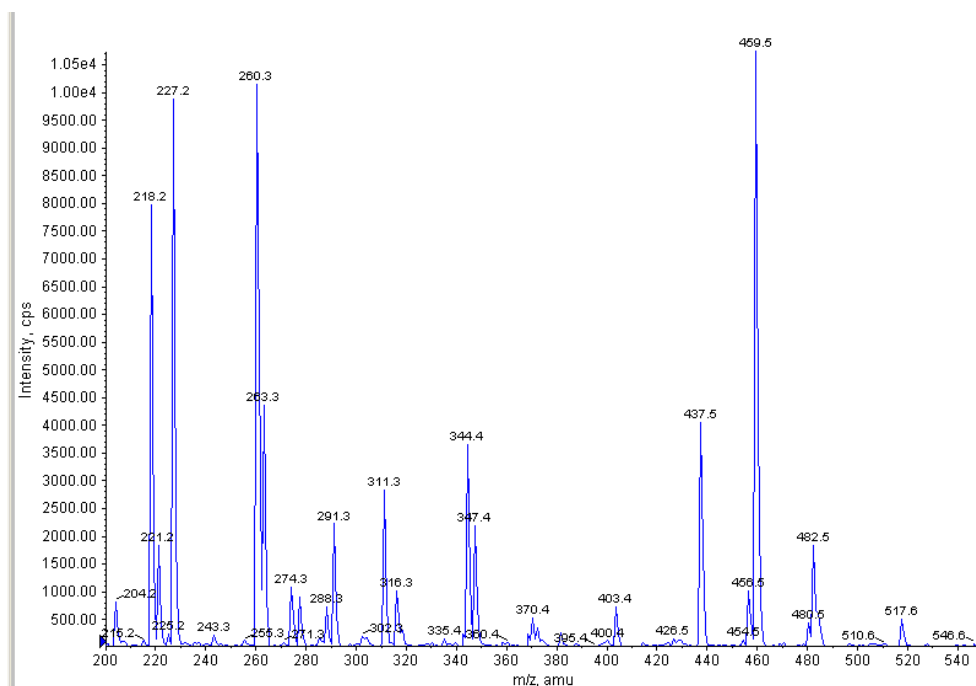


**Figura 66. Espectro MS/MS de AC de una muestra de sangre de un paciente con LCHAD**

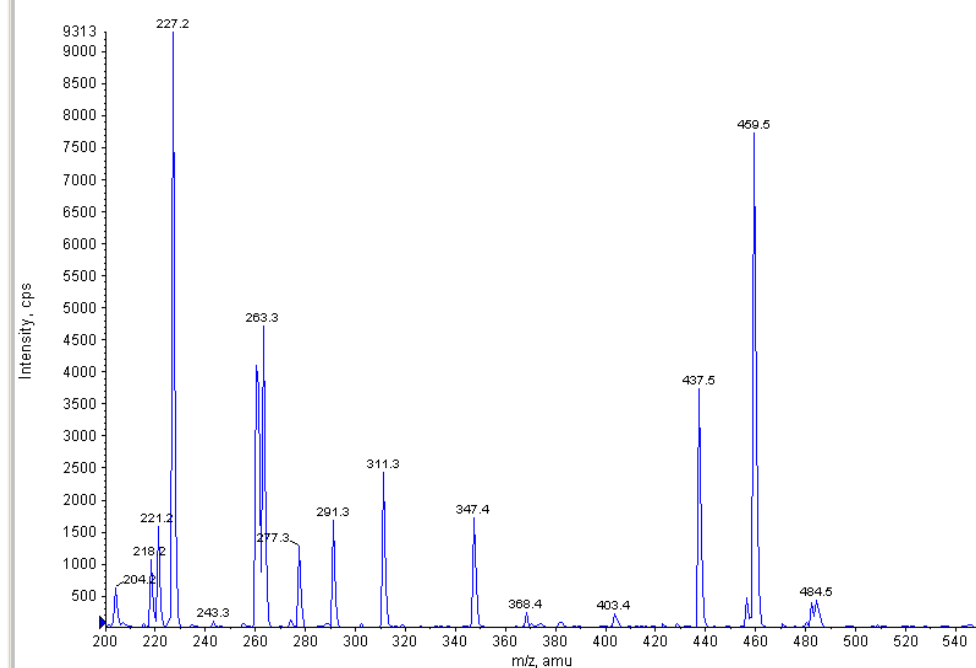


**Figura 67. Espectro MS/MS de AC de una muestra de sangre de un paciente con SCAD**

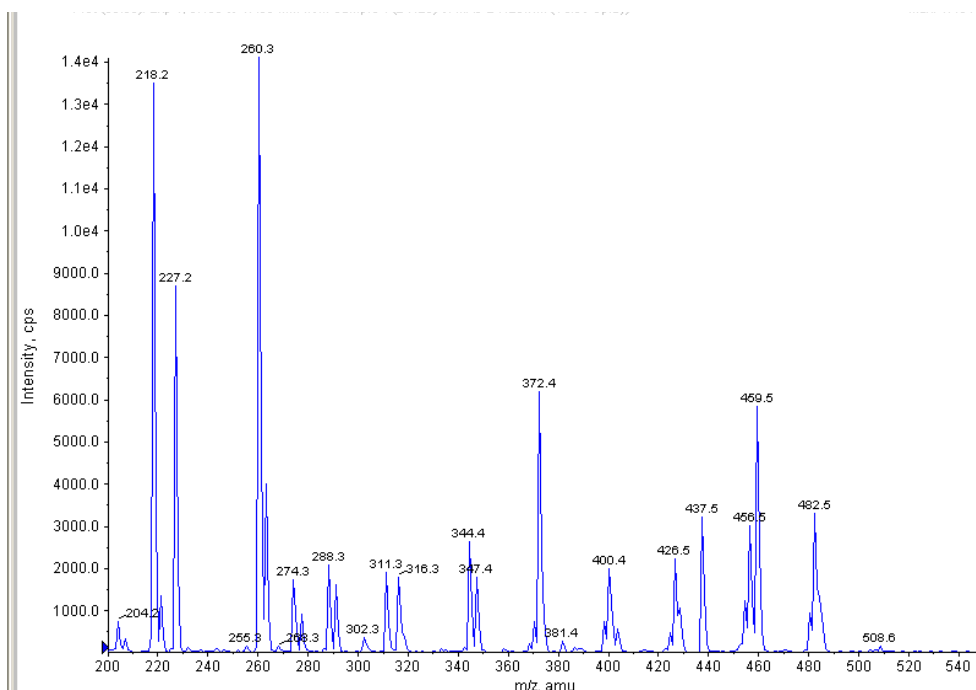
## Discusión



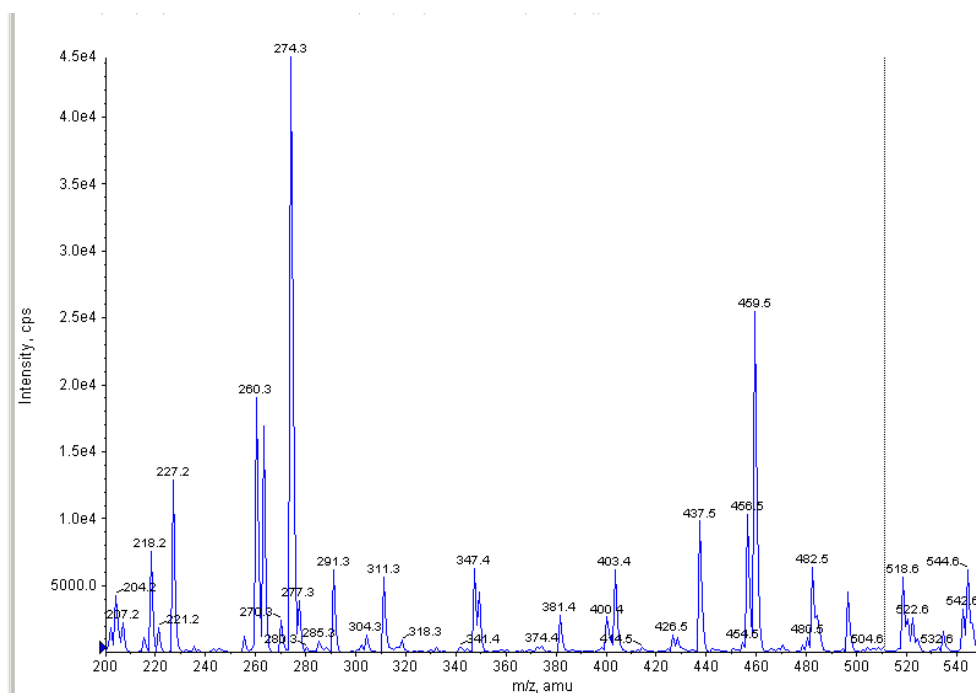
**Figura 68. Espectro MS/MS de AC de una muestra de sangre de un paciente con CPT II**



**Figura 69. Espectro MS/MS de AC de una muestra de sangre de un paciente con Defecto del Transportador de Carnitina**

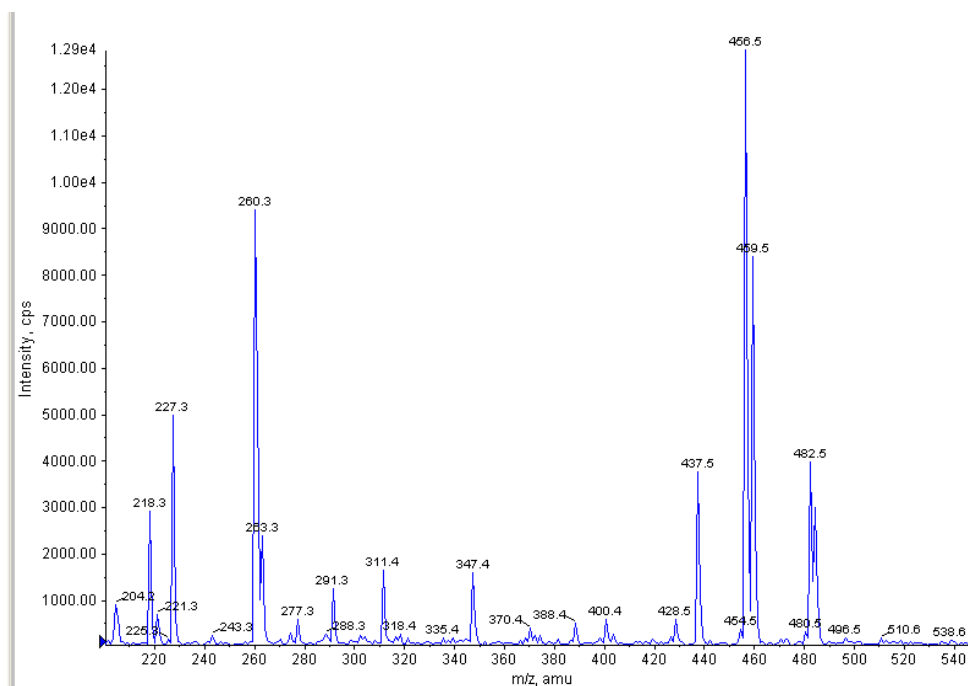


**Figura 70. Espectro MS/MS de AC de una muestra de sangre de un paciente con MADD**

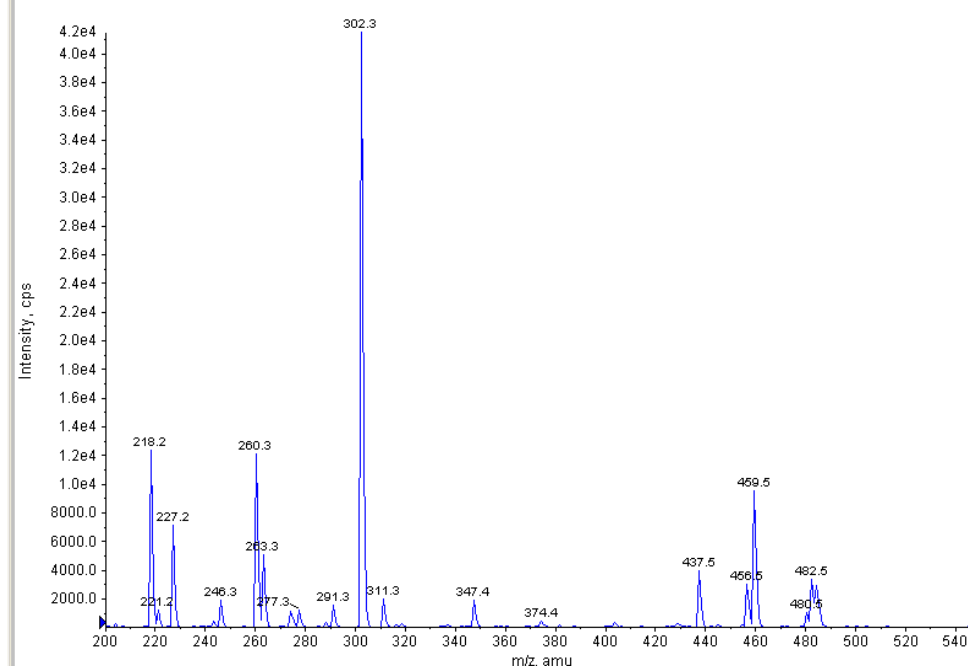


**Figura 71. Espectro MS/MS de AC de una muestra de sangre de un paciente con PA**

## Discusión

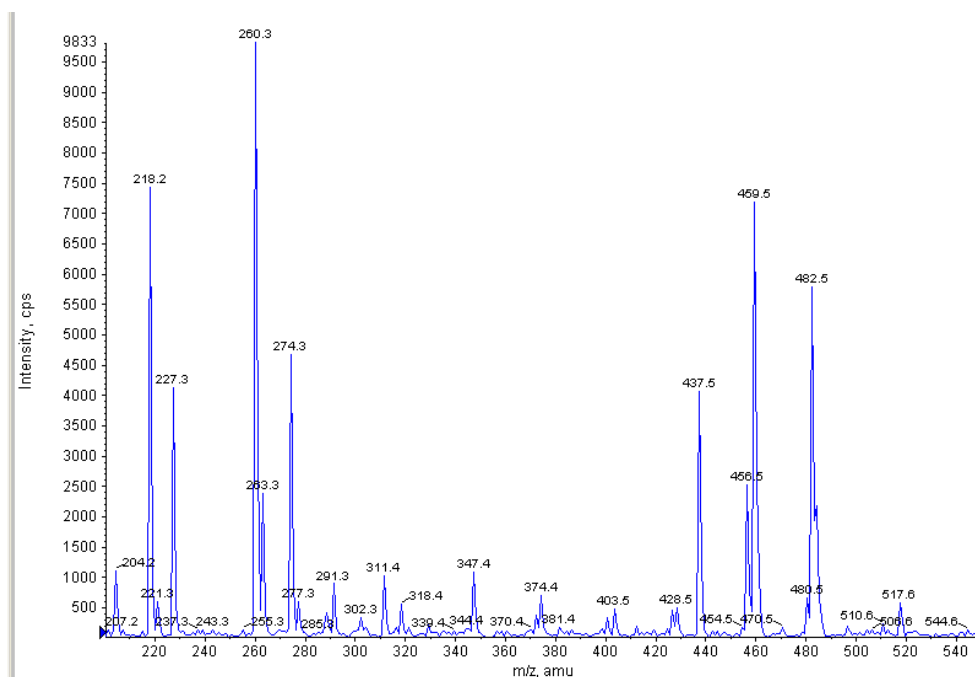


**Figura 72. Espectro MS/MS de AC de una muestra de sangre de un paciente con GA I**

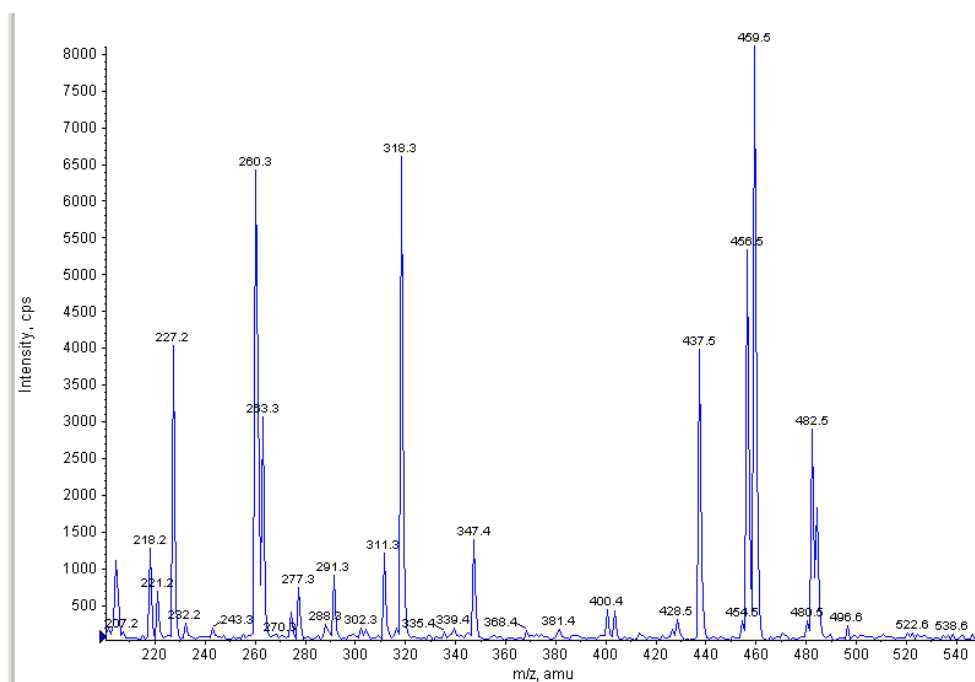


**Figura 73. Espectro MS/MS de AC de una muestra de sangre de un paciente con IVA**

## Discusión

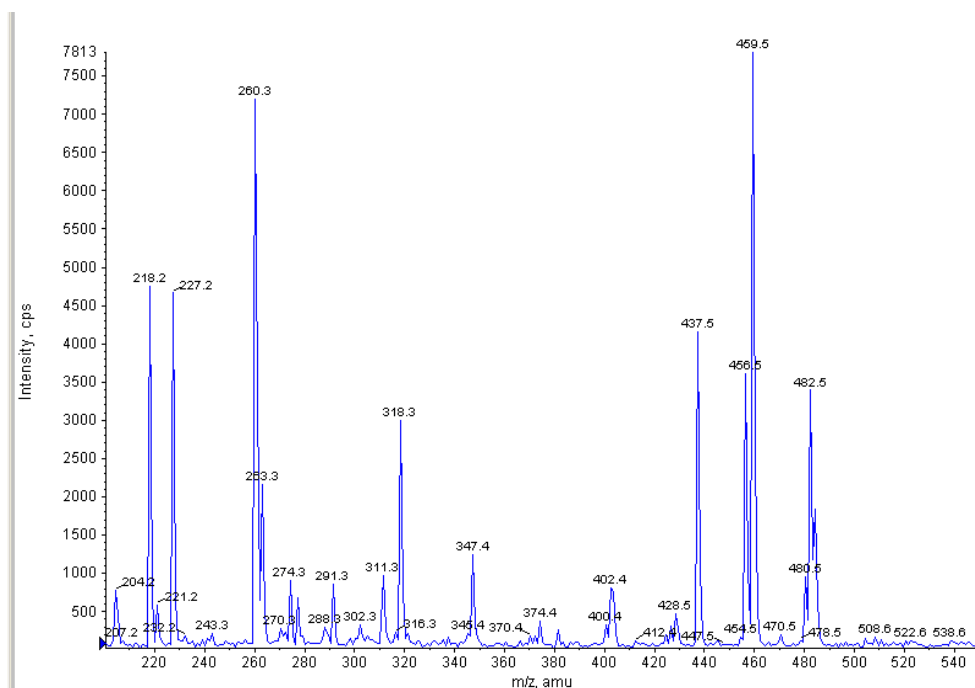


**Figura 74. Espectro MS/MS de AC de una muestra de sangre de un paciente con MMA**



**Figura 75. Espectro MS/MS de AC de una muestra de sangre de un paciente con MCC**





**Figura 76. Espectro MS/MS de AC de una muestra de sangre de un paciente con HMG**

## **Conclusiones**



## ***Conclusiones***

1. Se ha desarrollado un método de determinación de acilcarnitinas (AC) por Espectrometría de Masas en Tándem que permite la medida de perfiles de estos compuestos con la suficiente sensibilidad y selectividad como para ser utilizado para la medida de los niveles de concentración presentes en muestras biológicas.
2. Se ha puesto a punto una sistemática que, basándose en el método optimizado previamente, permite medir niveles de AC en muestras de sangre impregnadas sobre papel de forma semiautomática.
3. El método de determinación de AC en sangre cumple los criterios de precisión, exactitud, y linealidad expresados en los diferentes documentos publicados por el CLSI para la validación de métodos de análisis.
4. El método de cuantificación de AC en sangre impregnada en papel es válido tanto para establecer rangos de referencia como para marcar puntos de corte diagnósticos que permitan su aplicación en el diagnóstico precoz de determinados errores congénitos del metabolismo relacionados con su metabolismo.
5. La introducción de nuevos patrones internos marcados isotópicamente de C6 C10, C12 y C18 que mejorasen las posibilidades diagnósticas alteraban la exactitud en la medida de las correspondientes AC con menoscabo de las características analíticas generales del método desarrollado previamente, lo que hace que en el momento actual el patrón se limite al perfil ya establecido.
6. Apoyándose en los programas externos de control y de aseguramiento de la calidad del CDC se ha introducido una sistemática que permite la validación de los resultados obtenidos en cada experimento y el seguimiento día a día de las principales AC cara a la homogeneidad de los resultados y a su intercomparación con los obtenidos por otros laboratorios.
7. La base de datos desarrollada, en base a la aplicación informática chemoview®, permite la cuantificación de las AC en sangre y la comparación de forma automática con los puntos de corte establecidos para cada una de ellas.

## ***Conclusiones***

8. Se ha aplicado dicho método a la detección de alteraciones del metabolismo de ácidos orgánicos y ácidos grasos implicados en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial, en sangre impregnada sobre papel recogida en periodo neonatal.
9. Se ha realizado la determinación de AC, con el método propuesto, en un grupo de mas de 112000 muestras de sangre obtenidas durante el periodo comprendido entre junio 2000 y diciembre de 2005. Se han obtenido los rangos de referencia de AC en los diferentes grupos de la población infantil.
10. Se proponen puntos de corte diagnósticos para las diferentes AC analizadas de acuerdo con su utilidad en el diagnóstico precoz de diferentes Errores Congénitos del Metabolismo.
11. Se han evaluado las posibles modificaciones producidas en los rangos de referencia y en los puntos de corte en función de la edad, peso al nacimiento, alimentación y edad gestacional.
12. Con la información obtenida, se ha evaluado la modificación de puntos de corte o combinación de AC en la disminución del número de falsos positivos que se derivarían de la aplicación del método desarrollado en un programa de cribado poblacional.
13. El uso de la metódica desarrollada y su aplicación a un grupo amplio de población ha posibilitado nuevos diagnósticos de estos grupos de enfermedades entre la población neonatal.
14. Del presente trabajo se deduce la conveniencia de la incorporación de la determinación de AC al diagnóstico precoz de los Errores Congénitos del Metabolismo dentro de los programas de Cribado Ampliado Neonatal de Metabolopatías.

## **Bibliografía**



## ***Bibliografia***

- 
- <sup>1</sup> Wilson JMG, Jugner G. Principles and practice of screening for disease. Geneva: World Health Organisation; 1968. p26-39.
- <sup>2</sup> Guthrie R.. Screening for "inborn error of metabolism" in the newborn infant a multiple test program. Birth Defects Orig Artic Ser 1968; 4: 92-8.
- <sup>3</sup> Efron ML, Young D, Moser HW, MacCready RA.. A simple chromatographic screening test for the detectino of disorders of amino acid metabolism. N Engl J Med 1964; 270: 1378-83.
- <sup>4</sup> Scriver CR, Davies E, Cullen AM.. Application of a simple micro-method to the screening of plasma for a variety of aminoacidopaties. Lancet 1964; 2:230-2.
- <sup>5</sup> Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW et al.. The metabolic bases of inherited disease, 8.<sup>a</sup> ed. Nueva York: McGraw Hill, 2001.
- <sup>6</sup> Rinaldo P.. The impact of tandem mass spectrometry on Biochemical Genetics. Ital J Pediatr 2001;696-7.
- <sup>7</sup> Levy HL.. Newborn screening by Tandem Mass Spectrometry: A new era. Clin Chem 1998; 44:2401-2.
- <sup>8</sup> Chace DH, Sherwin JE, Hillman SL, Loery F, Cunningham GC.. Use of phenylalanine-to-tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of early discharge specimens collected during the first 24 hours. Clin Chem 1998; 44:2405-9.
- <sup>9</sup> Wilken B, Wiley V, Hammond J et al. Screening of newborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. N Eng J Med. 2003;348:2304-12.
- <sup>10</sup> Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D et al. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome and implications. Pediatrics 2003;111:1399-406.
- <sup>11</sup> Waisbren SE, Albers S, Amato S et al. Effect of expanded newborn screening for biochemical genetic disorders on child outcomes and parental stress. JAMA 2003;290:2564-72.



## *Bibliografía*

- <sup>12</sup> Burlina AB, Giordano G, Catuogno S, Zachchello F.. The role of tandem mass spectrometry in the diagnosis of metabolic disease: The experience in the Veneto area. *Ital J Pediatr* 2001; 27:766-73.
- <sup>13</sup> Comisión de Errores Metabólicos Congénitos. Datos acumulados: Programas de Cribado Neonatal en España (2003). (Acceso 13. octubre de 2005 en <http://www.seqc.es/article/articleview/239/1/192/> ).
- <sup>14</sup> Dulin E, Cortes E, Chamorro F, Eguilior I, Espada M, Pampols T, Ramon J. Actividad de los centros de detección precoz neonatal de errores congénitos del metabolismo en España. Evaluación sanitaria (1996-1999). *Boletín del Real Patronato sobre Discapacidad* 2001; N° 49.
- <sup>15</sup> Dirección Xeral de Saúde Pública. Guías de Saúde Pública. Serie II: Sección E. Endocrinas y Metab.: Informe 1. “Actualización del programa gallego para la detección precoz de enfermedades endocrinas y metabólicas en periodo neonatal. 1995-2003”. Santiago de Compostela: Conselleria de Sanidade, Xunta de Galicia; 2004.
- <sup>16</sup> Clague A, Thomas A. Neonatal biochemical screening for disease. *Clin Chim Acta* 2002;315:99-110
- <sup>17</sup> NCCLS. Obtención de sangre sobre papel de filtro en programas de cribado neonatal; Normativa aprobada. LA4-A3. Vol 17, N° 16. Octubre 1997.
- <sup>18</sup> NCCLS. Blood Collection on Filter Paper for Neonatal Screening Program - Fourth Addition; Document LA4-A4. November 2003.
- <sup>19</sup> American Academy of Pediatrics, Committee on Genetics guides in newborn screening. *Pediatrics*. 1992;89:345-9.
- <sup>20</sup> Chapman S. Carrier Mobility Spectra of Spray Electrified Liquids. *Physical Review* 1937;10:184-90.
- <sup>21</sup> Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB. Molecular beams of macroions. *Journal of Chemical Physics*, 1968;49:2240-9.
- <sup>22</sup> Yamashita M, Fenn JB. Electrospray Ion-Source—Another Variation on the Free-Jet Theme, *J. Phys. Chem.* 1984;88:4451–9.
- <sup>23</sup> Fenn JB. Electrospray Wings for Molecular Elephants. *Angewandte Chemie - International Edition* 2003;42:3871-94.

- 
- <sup>24</sup> Paul W, Steinwedel H. Ein neues massenspektrometer ohne magnetfeld. Zeitschrift für Naturforschung 1953;8A:448-50.
- <sup>25</sup> Paul W. Electromagnetic Traps for Charged and Neutral Particles. Agewandte Chemie - International Edition 1990;29:739-48.
- <sup>26</sup> Yost RA, Enke CG. Selected Ion Fragmentation with a Tandem Quadrupole Mass Spectrometer. Journal of the American Chemical Society 1978;100:2274-5.
- <sup>27</sup> Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW et al. Electrospray ionisation mass spectrometry: Principles and Clinical applications. Clin Biochem Rev 2003;24:3-12.
- <sup>28</sup> Rashed MS, Ozand PT, Bucknall MP, Little D. Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry. Pediatr Res 1995;38:324-31.
- <sup>29</sup> Rinaldo P, Tortorelli S, Matern D. Recent developments and new applications of tandem mass spectrometry in newborn screening. Curr Opin Pediatr 2004;16:427-33.
- <sup>30</sup> Bruins AP. Mechanistic aspects of electrospray ionization. J Chromatogr A 1998;794:345-57.
- <sup>31</sup> Lauridsen C, Leonard SW, Griffin DA, Lieber DC, McClure TD, Traber MG. Quantitative analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of deuterium-labeled and unlabeled vitamin E in biological samples. Anal Biochem 2001;289:89-95.
- <sup>32</sup> Vishwanathan K, Tackett RL, Stewart JT, Barlett MG. Determination of arginine and methylated arginines in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2000;748:157-66.
- <sup>33</sup> Wudy SA, Hartmann M, Svoboda M. Determination of 17-hydroxyprogesterone in plasma by stable isotope dilution/benchmark liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Horm Res 2000;53:68-71.
- <sup>34</sup> Streit F, Armstrong VW, Oellerich M. rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry routine method for simultaneous determination of sirolimus, everolimus, tacrolimus and cyclosporine A in whole blood. Clin Chem 2002;48:955-8.
- <sup>35</sup> Vogeser M, Zachoval R, Jacob K. Serum cortisol/cortisone ratio after Synacthen stimulation. Clin Biochem 2001;34:421-5.

- 
- <sup>36</sup> Blau N, Duran M, Blaskovics ME, (Ed.). Physician's Guide to the laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases. Springer-Verlag, Berlin 2003.
- <sup>37</sup> Rashed MS, Bucknall MP, Little D, Awad A, Jacob M, Alamoudi M et al. Screening blood spots for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry with a microplate batch process and a computer algorithm for automated flagging of abnormal profiles. Clin Chem 1997;43:1129-41.
- <sup>38</sup> Frazier DM, Millington DS, McCandless Se, Koeber DD, Weavil SD, Chaing SH, Muenzer J. The tandem mass spectrometry newborn screening experience in North Carolina: 1997-2005. J Inherit Metab Dis 2006; 29:76-85.
- <sup>39</sup> Zytkevich HT, Fitzgerald FE, Marsden D, Larson AC, Shih EV, Johnson MD, et al. Tandem Mass Spectrometric Analysis for Amino, Organic, and Fatty Acid Disorders in Newborn Dried Blood Spots: A Two-Year Summary from the New England Newborn Screening Program. Clin Chem 2001;47:1945-55.
- <sup>40</sup> Roscher A, Liebl B, Fingerhut R, Olgemoller B. Prospective STUDY of MS-MS newborn screening in Bavaria, Germany. Interim results. J.Inherit Metab Dis 2000;23 (Suppl 1):4.
- <sup>41</sup> Chace DH, Millington DS, Terada N, Kahler SG, Roe CR, Hoffman LF. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis of phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. Clin Chem 1993;39:66-71.
- <sup>42</sup> Chace DH, Sherwin JE, Hillman SL, Lorey F, Cunningham GC. Use of phenylalanine-to-tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of early discharge specimens collected in the first 24 hours. Clin Chem 1998;44:2405-9.
- <sup>43</sup> Chace DH, DiPerna JC, Mitchell BL, Sgroi B, Hofman LF, Naylor EW. Electrospray tandem mass spectrometry for analysis of acylcarnitines in dried postmortem blood specimens collected at autopsy from infants with unexplained cause of death. Clin Chem 2001;47:1166-82.
- <sup>44</sup> Jensen UG, Brandt NJ, Christensen E, Skovby F, Pedersen BN, Simonsen H. Neonatal screening for galactosemia by quantitative analysis of hexose monophosphates using tandem mass spectrometry: A retrospective study. Clin Chem 2001;47:1364-72.

- 
- <sup>45</sup> Mills KA, Musthaq I, Johnson AW, Whitfield PD, Clayton PT. A method for the quantitation of conjugated bile acids in dried blood spots using electrospray ionization-mass spectrometry. *Pediatr Res* 1998;43:361-8.
- <sup>46</sup> Mushtaq I, Logan S, Morris M, Johnson AW, Wade AM, Kelly D et al. Screening of newborn infants for cholestatic hepatobiliary disease with tandem mass spectrometry. *BMJ* 1999;319:471-7.
- <sup>47</sup> Johnson DW. A rapid screening method for the diagnosis of peroxisomal disorders: quantification of very long-chain fatty acids, as dimethylaminoethyl esters, in plasma and blood spots, by electrospray tandem mass spectrometry. *J Inherited Metab Dis* 2000;23:475-86.
- <sup>48</sup> Ito T, Van Kuilenburg ABP, Bootsma AH, Haasnoot AJ, Cruchten AV, Wada Y et al. Rapid screening of high-risk patients for disorders of purine and pyrimidine metabolism using HPLC-electrospray tandem mass spectrometry of liquid urine or urine –soaked filter paper strips. *Clin Chem* 2000;46:445-52.
- <sup>49</sup> Lacey J, Minutti CZ, Magera MJ et al. Improved specificity of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia by second-tier steroid profiling using tandem-mass spectrometry. *Clin Chem* 2004;47:1364-72.
- <sup>50</sup> Kobold U, Jeppsson JO, Dulffer T, Finke A, Hoelzel W, Miedema K. Candidate reference methods for hemoglobin A1c based on peptide mapping. *Clin Chem* 1997;43:1944-51.
- <sup>51</sup> Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T et al. IFCC reference method for measurement of HbA1c in human blood. *IFCC Ref method HbA1c* 2001;01.04.2001:1-23.
- <sup>52</sup> Willekens E, Thienpont LM, Stockl D, Kobold U, Hoelzel W, De Leenheer AP. Quantification of glycohemoglobin in blood by mass spectrometry applying multiple-reaction monitoring. *Clin Chem* 2000;46:281-3.
- <sup>53</sup> Nakanishi T, Miyazaki A, Iguchi K, Shimizu A. Effect of haemoglobin variants on routine glycohemoglobin measurements assessed by a mass spectrometric method. *Clin Chem* 2000;46:1689-92.

- 
- <sup>54</sup> Roberts NB, Amara AB, Morris M, Green BN. Long-term evaluation of electrospray ionization mass spectrometric analysis of glycated haemoglobin. *Clin Chem* 2001;47:316-21.
- <sup>55</sup> Li Y, Brockmann K, Turecek F et al. tandem mass spectrometry for the direct assay of enzymes in dried blood spots: application to newborn screening for Krabbe disease. *Clin Chem* 2004;50:638-40.
- <sup>56</sup> Ohura T, Kobayashi K, Abukawa D et al. A novel inborn error of metabolism detected by elevated methionine and/or galactose in newborn screening: neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency. *Eur J Pediatr* 2003;162:317-22.
- <sup>57</sup> CDC: recommendations and reports: "Using tandem mass spectrometry for metabolic disease screening among newborns." A report of work group, 2001;3:17-45.
- <sup>58</sup> Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. The application of Tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002;3:17-45.
- <sup>59</sup> Cocho JA, Castiñeiras DE, Fraga Bermudez JM. Cribado Neonatal de los Errores Congénitos del Metabolismo. En *Diagnóstico y Tratamiento de las Enfermedades Metabólicas Hereditarias* Ed 2ª. P Sanjurjo y A Baldellou Ed. Ed Ergon 2006. pag 1-16.
- <sup>60</sup> Wisconsin Newborn Screening Laboratory. [www.slh.wisc.edu/newborn/index.php](http://www.slh.wisc.edu/newborn/index.php) (5 mayo 2006).
- <sup>61</sup> Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of Tandem Mass Spectrometry for Multianalyte Screening of Dried Blood Specimens from Newborns. *Clin Chem* 2003; 49:1797-817.
- <sup>62</sup> Vaz FM, Melegh B, Bene J, Cuebas D, Gage DA, Bootsma A, et al. Analysis of carnitine biosynthesis metabolites in Urine by HPLC-electrospray Tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2002;48:826-34.
- <sup>63</sup> Kushnir M.M., Kumaromy-Hiller G., Shusshan B., Urry F.,M., Roberts W.L.. Analysis of dicarboxylic acids by tandem mass spectrometry. High-Throughput quantitative measurement of methylmalonic acid in serum, plasma and urine. *Clin Chem* 2001;47:1993-2002.

## ***Bibliografia***

- 
- <sup>64</sup> DiPerna C, Kalas TA, Johnson RW, Naylor EW. Rapid diagnosis of methylmalonic and propionic acidemias: quantitative tandem mass spectrometry analysis of propionylcarnitine in filter-paper blood specimens obtained from newborns. *Clin Chem* 2001;47:2040-2043.
- <sup>65</sup> Pinheiro M, Oliveira J, Santos M, Rocha H, Cardoso ML, Vilarinho L. Neoscreen: a software application for MS/MS newborn screening analysis. *Biological and Medical Data analysis* 2004;450-57.
- <sup>66</sup> Newborn Screening Quality Assurance Program. 2005 Annual Summary report. Vol 23. January 2006. Centers for Disease Control and Prevention.
- <sup>67</sup> CLSI. User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline-Second Edition. CLSI document EP15-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pensilvania, USA, 2005.
- <sup>68</sup> CLSI. Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory: General Principles and Guidance; Proposed Guideline. CLSI document C50-P. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pensilvania, USA, 2007.
- <sup>69</sup> NCCLS. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. NCCLS document EP6-A. NCCLS. Wayne, Pensilvania, USA, 2003.
- <sup>70</sup> NCCLS. Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. NCCLS document EP17-A, NCCLS, Wayne, Pensilvania, USA, 2004.
- <sup>71</sup> Reed AH, Wu GT. Evaluation of a transformation method for estimation of normal range. *Clin Chem* 1974;20:576-81.
- <sup>72</sup> Linnet K, Kondratovich M. A partly nonparametric procedure for determination of the limit of detection. *Clin Chem* 2004;50:732-40.
- <sup>73</sup> Rashed, M S, y otros. Rapid determination of orotic acid in urine by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2003;49:499-501.
- <sup>74</sup> Millington DS, Chace DH. Carnitine and Acylcarnitines in Metabolic Disease Diagnosis and Management. In: Desiderio DM, editor, *Mass Spectrometry: Clinical and Biomedical Applications*. Vol . New York; Plenum Press 1992. p 199-219.

- 
- <sup>75</sup> Millington DS, Kodo N, Norwood DL, Roe CR. Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 1990;13:321-4.
- <sup>76</sup> Carpenter KH, Wiley V. Application of tandem mass spectrometry to biochemical genetics and newborn screening. *Clinica Chimica Acta* 2002; 322:1-10.
- <sup>77</sup> Marzo A, Curti S. L-carnitine moiety assay: An up-to-date reappraisal covering the commonest methods for various applications. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997;702:1-20.
- <sup>78</sup> Kushnir MM, Komaromy-Hiller G, Shushan B, Urry FM, Roberts WL. Análisis of dicarboxylic acids by tandem mass spectrometry. High-throughput quantitative measurement of methylmalonic acid in serum, plasma, and urine. *Clin Chem* 2001;47:1993-2002.
- <sup>79</sup> Rolinski B, Amecke R, Dame T, Kreischer J, Olgemoller B, Wolf E et al. The biochemical metabolite screen in the Munich ENU Mouse Mutagenesis Project: determination of amino acids and acylcarnitines by tandem mass spectrometry. *Mamm Genome* 2000;11:547-51.
- <sup>80</sup> Millington D, Kodo N, Terada N, Roe D, Chace D. The analysis of diagnostic markers of genetic disorders in human blood and urine using tandem mass spectrometry with liquid secondary ion mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom Ion Process* 1991;111:2311-28.
- <sup>81</sup> Johnson DW. Inaccurate measurement of free carnitine by the electrospray tandem mass spectrometry screening method for blood spots. *J Inherit Metab Dis* 1999;22:201-2.
- <sup>82</sup> Manning NJ, Maloney M, Olpin SE, Pollit RJ, Bonham JR, Heap SJ, et al. Analysis of dicarboxylic-acylcarnitines by electrospray-tandem mass spectrometry (ESI-MSMS) without derivatization. Implications for neonatal screening and routine diagnosis. *J Inherit Metab Dis* 2001;24(Supplement):6.
- <sup>83</sup> Stevens RD, Hillman SL, Worthy S, Sanders D, Millington DS. Assay for free and total carnitine in human plasma using tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2000;46:727-29.
- <sup>84</sup> Rizzo C, Boenzi S, Wanders RJ, Duran M, Caruso U, Dinisi-Vici C. Characteristic acylcarnitine profiles in inherited defects of peroxisome biogenesis: a novel tool for screening diagnosis using tandem mass spectrometry. *Pediatr Res* 2003;53:1013-8.

- 
- <sup>85</sup> Norgaard-Pedersen B, Simonsen H. *Acta Paediatr* 1999;Suppl.432:106.
- <sup>86</sup> Strnadova KA, Holub M, Muhl A, Heinze G, Ratschmann R, Mascher H, et al. Long-term Stability of Amino Acids and Acylcarnitines in Dried Blood Spots. *Clin Chem* 2007;53:717-22.
- <sup>87</sup> Holub M, Tuschl K, Ratschmann R, Strnadova KA, Muhl A, Heinze G, et al. Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta* 2006;373:27-31.
- <sup>88</sup> Kayiran SM, Ozbek N, Turan M, Huracán B. Significant differences between capillary and venous complete blood counts in the neonatal period. *Clin Lab Haematol* 2003;25:9-16.
- <sup>89</sup> Bizarro MJ, Colson E, Ehrenkranz RA. Differential diagnosis and management of anemia in the newborn. *Pediatr Clin North Am* 2004;51:1087-107.
- <sup>90</sup> Adam BW, Alexander JR, Smith SJ et al. Recoveries of phenylalanine from two sets of dried-blood-spot reference materials: prediction from hematocrit, spot volume and paper matrix. *Clin Chem* 2000;46:126-8.
- <sup>91</sup> Therrell BL, Hannon WH, Pass KA, Loret F, Brokopp C, Eckman J, et al. Guidelines for the retention, storage, and use of residual dried spot samples after newborn screening analysis: statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services. *Biochem Mol Med* 1996;57:116-24.
- <sup>92</sup> Chace DH, DiPerna JC, Adam BW, Hannon H. Errors caused by the use of D,L-Octanoylcarnitine for Blood-Spot calibrators. *Clin Chem* 2001;47:758-60.
- <sup>93</sup> Chace DH, DiPerna JC, Kalas TA, Jonson RW, Taylor EW. Rapid diagnosis of methylmalonic and propionic acidemias: quantitative tandem mass spectrometry analysis of propionylcarnitine in filter-paper blood specimens obtained from newborns. *Clin Chem* 2001;47:2040-4.
- <sup>94</sup> Chace DH. Mass spectrometry in the clinical laboratory. *Chem Rev* 2001;101:445-77.
- <sup>95</sup> Khoury MJ, McCabe LL, McCabe ER. Population screening in the age of genomic medicine. *N Engl J Med* 2003;348:50-58.



## ***Bibliografia***

- 
- <sup>96</sup> Adam BW, Alexander JR, Smith SL, Chace DH, Loeber JG. Recoveries of phenylalanine from two sets of dried-blood-spot reference materials: prediction from hematocrit, spot volume and paper matrix. Clin Chem 2000; 46:126-8.
- <sup>97</sup> Webster D, Dhondt JL, Hannon WH, Loeber G, Torresani T. Quality assurance and standarization: summary of the satellite meeting. Turku, Finland 11-12 june 1999. Acta Paediatr Suppl 1999;88:7-12.
- <sup>98</sup> NCCLS. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples: Approved Guideline-Second Edition. NCCLS document EP9-A2. NCCLS, Wayne, Pensilvania USA, 2002.
- <sup>99</sup> <http://www.cdc.gov/labstandards/nsqap.htm> (30/07/2007)
- <sup>100</sup> <http://wwwn.cdc.gov/NSQAP/restricted/CDCCutOffs.aspx> (30/07/2007)
- <sup>101</sup> Chace DH, Hillman SL, Van Hove JLK, Naylor EW. Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of actanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. Clin Chem 1997;43:2106-13.
- <sup>102</sup> Vogeser M. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry-Application in the Clinical Laboratory. Clin Chem Lab Med 2003;41:117-126.
- <sup>103</sup> Rashed MS. Clinical applications of tandem mass spectrometry: ten years of diagnosis and screening of inherited metabolic diseases. Journal of Chromatography B, 2001;
- <sup>104</sup> Ziegler HJ, Bruckner P, Binon F. o-Acylation of DL-carnitine chloride. J Org Chem 1967; 32:3989-91.
- <sup>105</sup> Borum PR. Carnitine in neonatal nutrition. J Child Neurol 1995;10(suppl):2S25-2S31.
- <sup>106</sup> Campoy C, Bayes R, Peinado JM, Rivero M, Lopez C, Molina-Font JA. Evaluation of carnitine nutritional status in full-term newborn infants. Early Human Dev 1998;53(suppl):S149-S164.
- <sup>107</sup> Novack M, Wieser PB, Buch M, Hahn P. Acetylcarnitine and free carnitine in body fluids before and after birth. Pediatr Res 1979;13:10-15.
- <sup>108</sup> Millington DS. Tandem mass spectrometry in clinical diagnosis. En: Blau N, Duran D, Blaskovics ME, Gibson KL, eds. Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases. Berlin: Springer, 2003:57-75.

## ***Bibliografia***

- 
- <sup>109</sup> Shenai JP, Borum PR, Mohan P, Donlevy SC. Carnitine status at birth of newborn infants of varying gestation. *Pediatr Res* 1983; 17:579-82.
- <sup>110</sup> Schoderbeck M, Auer B, Legenstein E, Genger H, Sevela P, Salzer H, et al. Pregnancy-related changes of carnitine and acylcarnitine concentrations of plasma and erythrocytes. *J Perinat Med* 1995;23:477-85.
- <sup>111</sup> Chace DH, Pons R, Chiriboga CA, McMahon DJ, Tein I, Naylor EW, et al. Neonatal Blood Carnitine concentrations: Normative data by electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Ped Res* 2003;53:823-29.
- <sup>112</sup> Cavedon CT, Bourdoux P, Mertens K, Van Thi HV, Herremans N, De Laet C, Goyens P. Age-related variations in acylcarnitine and free carnitina concentrations measured by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2005;51:745-52.
- <sup>113</sup> Meyburg J, Schulze A, Rohlmueller D, Linderkamp O, Mayatepek E. Postnatal changes in neonatal acylcarnitine profile. *Pediatric Research* 2001;49:125-9.
- <sup>114</sup> Penn D, Schimdt-Sommerfeld E, Pascu F. Decreased tissue carnitina concentration in newborn infants receiving total parenteral nutrition. *J Pediatr* 1981;98:976-978.
- <sup>115</sup> De Sousa C, English NR, Stacey TE, Chalmers RA. Measurement of L-Carnitine and acylcarnitines in body fluids and tissues in children and adults. *Clin Chim Acta* 1990;187:317-28.
- <sup>116</sup> Hahn P, Novak M. How important are carnitine and ketones for the newborn infant?. *Fed Proc* 1985;44:2369-73.
- <sup>117</sup> Ramsay RR. Carnitine and its role in acyl group metabolism. *Essays Biochem* 1994;28:47-61.
- <sup>118</sup> Girard J, Ferre P, Pegorier JP, Duee PH. Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. *Physiol Rev* 1992;72:507-62.
- <sup>119</sup> Chace DH, Hillman SL, Van Hove JL, Taylor EW. Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitatively analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 1997;43:2106-13.
- <sup>120</sup> Lafolla AK, Thompson RJ, Roe CR. Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical course in 120 affected children. *J Pediatr* 1994;124:409-15.

- 
- <sup>121</sup> Fromenty B, Mansouri A, Bonnefont JP, Courtois F, Munnich A, Rabier D, Pessayre D. Most cases of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency escape detection in France. *Hum Genet.* 1996;97:367-8.
- <sup>122</sup> Giannacopoulou CH, Evangeliou A, Matalliotakis I, Relakis K, Sbirakis N, Hatzadaki E et al. Effects of gestation age and of birth weight in the concentration of carnitine in umbilical plasma. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1998;25:42-5.
- <sup>123</sup> Penn D, Ludwigs B, Schmidt-Sommerfeld E, Pascu F. Effect of nutrition on tissue carnitine concentration in infants of different gestational ages. *Biol Neonate* 1985;47:130-135.
- <sup>124</sup> Yoon H, Lee KR, Kang S, Lee DH, Yoo HW, Min WK et al. Screening of newborns and high-risk group of children for inborn metabolic disorders using tandem mass spectrometry in South Korea: a three-year report. *Clinica Chimica Acta* 2005;205:167-80.
- <sup>125</sup> Mattern D, Tortorelli S, Oglesbee D, Gavrilov D, Rinaldo P. Reduction of the false-positive rate in newborn screening by implementation of MS/MS-based second-tier tests: The Mayo Clinic experience (2004-2007). *J Inher Metab Dis* 2007;23:Epub ahead of print.
- <sup>126</sup> Rebollido M, Cocho JA, Castiñeiras DE, Boveda MD y Fraga. Aplicación de la Espectrometría de masas en tandem al análisis de aminoácidos, acilcarnitinas, acilglicinas y ácidos orgánicos en muestras de orina en papel. *Química Clínica* 2006;25:64-74.
- <sup>127</sup> American College of Medical Genetics (ACMG). Newborn Screening Expert Group 2006. Newborn screening toward a uniform screening panel and system-executive summary. *Pediatrics* 117(part 2):S296-S307.
- <sup>128</sup> [www.Region4genetics.org](http://www.Region4genetics.org) (30.07.2007)
- <sup>129</sup> Rinaldo P, Safari S, Tortorelli S, Mattern D. Making the case for objective performance metrics in newborn screening by tandem mass spectrometry. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 2006;12:255-61.
- <sup>130</sup> Kwon C, Farell PM. The magnitude and challenge of false positive newborn screening results. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000;154:714-8.
- <sup>131</sup> Tarini BA, Christakis DA, Welch HG. State Newborn Screening in the Tandem Mass Spectrometry Era: More Tests, More False-Positive Results. *Pediatrics* 2006;118:448-56.

## ***Bibliografia***

- 
- <sup>132</sup> Staedler SC, Polanetz R, Maier EM, Heidenreich SC, Niederer B, Mayerhofer PU et al. Newborn screening for 3-methylcrotonyl-CoA Carboxilase deficiency: population heterogeneity of MCCA and MCCB mutations and impact on risk assessment. *Human Mutation* 2006;27:748-59.
- <sup>133</sup> Garg U, Dasouki M. Expanded newborn screening of inherited metabolic disorders by Tandem mass spectrometry: clinical and laboratory aspects. *Clinical Biochemistry* 2006;39:315-32.
- <sup>134</sup> Outlaw WM, Vida JA. Impaired fatty acid oxidation as a cause of liver disease associated with hyperemesis gravidarum. *Med Hypotheses* 2005;65:1150-3.
- <sup>135</sup> Rinaldo P, Matern D, Bennett MJ. Fatty acid oxidation disorders. *Annu Rev Physiol* 2002;64:477-502.
- <sup>136</sup> Bennet MJ, Rinaldo P, Strauss AW. Inborn Errors of mitochondrial fatty acid oxidation. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2000;37:1-44.
- <sup>137</sup> Ellaway CJ, Wilcken B, Christodoulou J. Clinical approach to inborn errors of metabolism presenting in the newborn period. *J Paediatr Chil Health* 2002;38:511-7.
- <sup>138</sup> Horster F, Hoffmann GF. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of methylmalonic aciduria-Recent advances and new challenges. *Pediatr Nephrol* 2004;19:1071-4.
- <sup>139</sup> Chace DH, Kalas TA. A biochemical perspective on the use of Tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. *Clinical Biochemistry* 2005;38:296-309.